



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA UNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TÍTULO:

**DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE  
AUTOANTICUERPOS TIROIDEOS Y PERFIL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T  
CD8+ DE PACIENTES CON OFTALMOPATIA DISTIROIDEA EN FASE ACTIVA.**

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA EN  
OFTALMOLOGÍA

**PRESENTA:**

KAREN JANETH ARRIOZOLA RODRÍGUEZ

**TUTORES:**

CLAUDIA MURILLO CORREA. FACULTAD DE MEDICINA. PROGRAMA DE  
ESPECIALIZACIÓN MÉDICA EN OFTALMOLOGÍA.  
MARIA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ. FACULTAD DE MEDICINA. PROGRAMA  
DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS.

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

LUIS ALBERTO SALAZAR LOPEZ. FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2015



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.

# INDICE

Portada.....	1
Índice.....	2
Resumen.....	3
Introducción (marco teórico).....	5
Pregunta investigación.....	7
Justificación.....	7
Hipótesis.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Diseño del estudio.....	7
Material y métodos.....	8
Variables a estudiar.....	10
Análisis de resultados.....	10
Cronograma de actividades.....	11
Consideraciones éticas.....	11
Bioseguridad.....	11
Financiamiento de la investigación.....	11
Conflicto intereses.....	11
Resultados.....	12
Discusión.....	12
Conclusión.....	13
Apéndices:	
a.. Consentimiento informado.....	14
b.. NO SPECS.....	17
c.. CAS.....	18
d.. VISA.....	19
3.. Base datos.....	20
Bibliografía.....	23

---

---

## RESUMEN

### JUSTIFICACIÓN

La oftalmopatía distiroidea (OD) es una manifestación de la enfermedad sistémica autoinmune que afecta la órbita, se asocia con proptosis desfigurante, retracción del párpado, dolor, inflamación, edema periorbital, diplopía, queratitis, y, en algunos casos, ceguera.

El mecanismo preciso que asocia a la OD y a la enfermedad tiroidea no es claro. Se piensa que la expresión del receptor para la Hormona Estimulante de Tiroides (*Thyroid Stimulated Hormone, TSH*) en miocitos y adipocitos, y la presencia de el anticuerpo contra el receptor de TSH (*Thyroid Stimulated Hormone receptor Antibody, TSHrAb*) pueden ser la causa de la afectación orbitaria, sin embargo, es discutido que sólo los TSHrAb sean causantes de la patología. El TSHrAb está presente hasta en 98% de los pacientes con OD sin tratamiento, no obstante los anticuerpos anti-Tiroperoxidasa (Ab-TPO) y anti-Tiroglobulina (Ab-TG) también son detectables en gran parte de los pacientes con OD y aunque no se han asociado a la presentación ni a la severidad de la enfermedad son parte del diagnóstico de OD.

Aunado a lo anterior, en tejido graso periorbitario de individuos con OD se ha encontrado infiltrado de células T, este patrón de reclutamiento celular comparte similitudes con lo que ocurre en el tejido tiroideo. Existe un predominio de células T, en particular CD8+, que pueden ser identificadas de forma temprana en la OD. Durante el curso de evolución de la enfermedad (temprano o tardío) podrían existir diferencias en los estados de activación de las células T CD8+, estas diferencias consiguen determinarse por marcadores de expresión inmunofenotípicos como es el CD69 y el CD57.

Hasta ahora, sólo se considera que la elevación de las concentraciones de TSH y TSHrAb está relacionada con el daño tisular y probablemente con la presentación clínica, pero el daño no se explica en los casos donde estos indicadores no tienen alteraciones en su presencia y concentraciones. Actualmente no existen reportes que correlacionen el perfil de activación de las células T CD8+ y las concentraciones séricas de Ab-TGO y Ab-TGP con el predominio de la severidad de la afectación palpebral o muscular en la OD.

### HIPÓTESIS

La presentación clínica de los pacientes con OD depende del tipo de auto-anticuerpo (TSH, TSHrAb, TGO y TGP) elevado y del perfil de activación de las células T CD8+.

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe correlación entre la presentación clínica y la severidad de la enfermedad con el perfil de activación de células T CD8+ en pacientes con OD.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizará un análisis prospectivo de pacientes que son valorados por primera vez en la clínica de tiroides del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana y que tengan algún dato de actividad de OD.

1. Confirmación del diagnóstico de OD, evaluación oftalmológica y estadificación de la actividad por escala VISA, NO SPECS y CAS.
2. Determinación de los niveles séricos de TSH, T3 y T4 y de auto-anticuerpos tiroideos.
3. Determinación del perfil de activación de células T CD8+ por citometría de flujo.
4. Separación de células T CD8+.
5. Cultivo y estimulación de células T CD8+.
6. Evaluación de la expresión de superficie de CD69 y CD57 e inducción del TSH-R en células T CD8+.

### **ANÁLISIS DE RESULTADOS**

El análisis estadístico se hará utilizando la prueba de ANNOVA, además se obtendrán los valores de media, moda y mediana para la determinación de la severidad clínica y se usará la prueba de Spearman para correlacionar la positividad de los anticuerpos con la actividad de la enfermedad y se tomará como significativa una  $p < 0.05$ .

---

## 1. Introducción

La oftalmopatía distiroidea (OD) es una manifestación de la enfermedad inflamatoria sistémica autoinmune que afecta la órbita. La OD se asocia con proptosis desfigurante, retracción del párpado, dolor, inflamación, edema periorbital, diplopía, queratitis, y, en algunos casos, ceguera. Se estima que ocurre en 25-50% de los pacientes con enfermedad de Graves, y hasta en 2% de los pacientes con tiroiditis crónica ocasionada por otras patologías.<sup>1,2</sup>

La incidencia anual de la enfermedad es de 16 por cada 100,000 habitantes en mujeres y 2.9 por 100,000 habitantes, en hombres; tiene una prevalencia de 0.25%, aunque en diferentes partes del mundo la prevalencia varía de 0.1 a 0.3%.<sup>3</sup> La OD, en el 40-65% de los casos, ocasiona compresión del nervio óptico, causando en inicio, disminución de la agudeza visual y en estadios posteriores, ceguera.<sup>4</sup> El desarrollo de OD y el inicio de hipertiroidismo son prácticamente simultáneos, ya que no hay diferencia de más de 6 meses en la presentación de OD y otros síntomas de la Enfermedad de Graves.<sup>5</sup> Esto contrasta al momento del diagnóstico de la OD, ya que, 80-90%<sup>6,7</sup> de los pacientes presentan hipertiroidismo clínico asociado a Graves, 3.3% tiroiditis de Hashimoto y 5.8% se encuentran eutiroideos, pero la incidencia de OD en pacientes que nunca han sido hipertiroideos es variable y puede oscilar entre 2.5 al 34.3%, por lo que un perfil hormonal dentro de límites normales no descarta esta patología.<sup>6</sup>

El involucro orbitario en la Enfermedad de Graves clínicamente consiste en la combinación de edema, retracción palpebral, alteración en la movilidad ocular, proptosis y, en ocasiones, compresión del nervio óptico;<sup>4</sup> la infiltración celular en el tejido conectivo de la órbita<sup>8</sup> genera agrandamiento de los músculos extra-oculares (MEO) y del tejido adiposo,<sup>9,10</sup> pero se describe el predominio de una afectación clínica sobre la otra, es decir, preponderancia del daño en MEO sobre tejido adiposo o viceversa.<sup>9</sup> El mecanismo preciso que asocia a la OD y a la enfermedad tiroidea no es claro. Se piensa que la expresión del receptor para la Hormona Estimulante de Tiroides (*Thyroid Stimulated Hormone*, TSH) en miocitos y adipocitos, y la presencia de el anticuerpo contra el receptor de TSH (*Thyroid Stimulated Hormone receptor Antibody*, TSHrAb) pueden ser la causa de la afectación orbitaria,<sup>11</sup> sin embargo, es discutido que sólo los TSHrAb sean causantes de la patología; las concentraciones séricas de TSHrAb no siempre correlacionan con las características clínicas de la OD.<sup>12,13</sup>

Además de la elevada concentración de TSH, la enfermedad distiroidea se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos circulantes<sup>2</sup>, el más caracterizado de ellos es dirigido contra el receptor de TSH. El TSHrAb está presente hasta en 98% de los pacientes con OD sin tratamiento<sup>11,14</sup> no obstante los anticuerpos anti-Tiroperoxidasa (Ab-TPO) y anti-Tiroglobulina (Ab-TG) también son detectables en gran parte de los pacientes con OD<sup>2</sup> y aunque no se han asociado a la severidad ni la actividad de la enfermedad son parte del diagnóstico de OD<sup>12</sup>. Se han encontrado diferencias en el perfil de concentración sérica de TSHrAb y Ab-TPO y Ab-TG entre los pacientes con síntomas tiroideos y síntomas predominantemente orbitarios, en estos últimos, existe un aumento de TSHrAb y disminución de Ab-TPO y Ab-TG. Contrario a lo anterior, hay reportes en donde los pacientes presentan retracción palpebral, edema en la misma zona y en músculos extra-oculares y aumento en la concentración de Ab-TPO y Ab-TG, sin cambios en los niveles de TSHrAb<sup>15</sup>.

El proceso inflamatorio asociado a la OD que genera el daño orbitario con sus respectivas complicaciones y que se origina por la Enfermedad de Graves, incluye la participación de

poblaciones celulares como macrófagos, células B y T y fibroblastos, además de los diversos mecanismos que resultan de la activación de estas células <sup>16</sup>.

Por ejemplo, para el caso de los fibroblastos orbitales se plantea que expresan una gran variedad de receptores en la superficie celular, estos receptores incluyen a colágena I, TSHR, Tg, quimiocinas proinflamatorias como CXR4 y con un fenotipo CD45+CD34+ <sup>17</sup>.

Aunado a lo anterior, en tejido graso periorbitario de individuos con OD se ha encontrado infiltrado de células T<sup>18</sup>, este patrón de reclutamiento celular comparte similitudes con lo que ocurre en el tejido tiroideo <sup>19</sup>. Existe un predominio de células T, en particular CD8+, que pueden ser identificadas de forma temprana en la OD, además resulta interesante mencionar que en la fase temprana de la enfermedad predomina la respuesta Th1, mientras que el fenotipo Th2 prevalece en etapas más tardías <sup>20</sup>; durante el curso de evolución de la enfermedad (temprano o tardío) podrían existir diferencias en los estados de activación de las células T CD8+, estas diferencias consiguen determinarse por marcadores de expresión inmunofenotípicos como es el CD69 y el CD57; CD69 reconocido para activación temprana y CD57, activación tardía<sup>20b,20c</sup>.

Esto corresponde con lo reportado en modelos murinos en donde una población específica de células ha sido identificada y se ha asociado a la OD en la Enfermedad de Graves. Se caracterizan como células T CD8+CD122+, su disminución se relaciona con incremento en la incidencia de hipertiroidismo. Además, también se ha reportado que la presencia de células T CD8+CD57+, se ve implicada en la presentación clínica de la OD <sup>21</sup>.

El proceso de remodelación asociado con la migración inducido por la activación celular puede resultar dependiente de la TSH, ya que esta hormona es capaz de estimular a células T CD8+, las cuales sintetizan citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IP-10 capaces de inducir migración celular y por lo tanto, aumento del infiltrado inflamatorio en tejido conjuntivo. También la TSH induce la activación de células B que favorece la síntesis de TSHrAb que actúan en fibroblastos para la acumulación de proteoglicanos que se acumulan en el tejido muscular y adiposo orbitario. Además la IP-10 sintetizada por células T CD8+ gracias a la acción de la TSH, tiene efectos sinérgicos a los TSHrAb y en previos reportes se ha observado que la población de células T CD8+ puede participar en la severidad del daño en la OD, las CD8+CD57+<sup>22</sup>, pero no se ha comprobado la participación de TSHrAb sobre la inducción de un fenotipo de activación específico de células T CD8+ implicadas en el daño relacionado con la OD.

En cuanto al diagnóstico de la OD es importante el perfil de anticuerpos y los niveles de hormonas circulantes, además de clasificar la enfermedad en cuanto a severidad y actividad. Se han establecido escalas que estadifican los cambios oftalmológicos por severidad, como la escala NO SPECS <sup>23</sup>, además existe la escala de actividad clínica (*Clinical Activity Score, CAS*)<sup>24</sup> que cuantifica los cambios en la severidad del proceso inflamatorio en el tejido periorbitario y en el tejido conectivo adiposo, además de evaluar progresión; y la más reciente escala VISA <sup>25</sup>, que incluye la evaluación tanto de actividad como severidad y estadifica la enfermedad para poder tomar decisiones de tratamiento.

Las afectaciones clínicas de la OD son documentadas mediante tomografía computada en la cual se cuantifica el agrandamiento de los músculos extra-oculares, el aumento en el volumen de la grasa orbitaria y la estasis venosa ocasionada por el aumento del contenido orbitario <sup>26</sup>.

Hasta ahora, sólo se considera que la elevación de las concentraciones de TSH y TSHrAb está relacionada con el daño tisular y probablemente con la presentación clínica <sup>11</sup>, pero el daño no se explica en los casos donde estos indicadores no tienen alteraciones en su presencia y concentraciones. Actualmente no existen reportes que correlacionen el perfil de activación de las células T CD8+ y las concentraciones séricas de Ab-TGO y Ab-TGP con el predominio de la severidad de la afectación palpebral o muscular en la OD.

## **2. Pregunta de Investigación**

¿Existe correlación clínica de la presentación de la orbitopatía tiroidea con el tipo de anticuerpo elevado y con el perfil de activación de células T CD8+?

## **3. Justificación.**

Existe controversia en cuanto a la correlación entre la severidad clínica de la oftalmopatía tiroidea con los anticuerpos, en específico con los anticuerpos estimulantes de TSH, además, se tienen reportes en los que la afectación es principalmente muscular lo cual no se explica ni por los niveles de TSH ni por el mecanismo fisiopatológico más común que es la infiltración grasa debido a la activación de las células T CD8+ por los anticuerpos anti-TSH.

En la literatura se enfatiza la utilidad del TSHrAb para el diagnóstico de la OD, pero no existe mención de los otros anticuerpos en relación con el inicio de la orbitopatía. En México, como en el resto del mundo, el diagnóstico se realiza con los hallazgos clínicos y tomográficos; la concentración sérica de TSH se toma con inferencia del daño tisular y por lo tanto, de la severidad clínica, sin embargo, no se ha estudiado la utilidad clínica de las concentraciones séricas de los anticuerpos anti-TGO y anti-TP y la presencia de células T CD8+CD69+ y CD8+CD57+ en esta patología.

## **4. Hipótesis.**

La presentación clínica de los pacientes con OD depende del tipo de auto-anticuerpo (TSH, TSHrAb, TGO y TGP) elevado y del perfil de activación de las células T CD8+.

## **5. Objetivo General.**

Determinar si existe correlación entre la presentación clínica y la severidad de la enfermedad con el perfil de activación de células T CD8+ en pacientes con OD.

## **6. Objetivos específicos.**

- a. Evaluar la presentación clínica prevalente al momento del diagnóstico de la OD.
- b. Determinar los niveles séricos de TSH, T3, T4, anti-TSH, anti-TSHrAb, anti-TG y anti-TPO
- c. Determinar la presencia de poblaciones de células T CD8+CD69+ y CD8+CD57+ en sangre periférica e inducida *ex vivo* por anticuerpos anti-TSHrAb y anti-TSH.
- d. Evaluar la correlación entre la actividad de la enfermedad, los niveles séricos de los anticuerpos anti-TSH, anti-TSHrAb, anti-TG y anti-TPO y la presencia de células CD8+CD69+ y CD8+CD57+ en sangre periférica.

## **7. Diseño del estudio:**

Prospectivo, transversal y comparativo.

## 8. Material y Métodos:

Se realizará un análisis prospectivo de pacientes que son valorados por primera vez en la clínica de tiroides del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana y que tengan algún dato de actividad de OD.

1. Confirmación del diagnóstico de OD, evaluación oftalmológica y estadificación de la actividad por escala VISA, NO SPECS y CAS (ver anexo).

2. Determinación de los niveles séricos de TSH, T3 y T4 y de auto-anticuerpos tiroideos:

Se obtendrán 5mL de sangre periférica en un tubo Vacutainer SST® (BD Systems), posteriormente se centrifugarán a 300 x g por 6 minutos y se obtendrá el sobrenadante para la determinación de anticuerpos séricos anti-TSH, anti-TGO, anti-TP, (ImmunoAssay System COBAS e411 Elecsys® ROCHE) y anti-TSHr (Elisa kit MyBioSource, EUA).

3. Determinación del perfil de activación de células T CD8+ por citometría de flujo:

Se obtendrán 10mL de sangre periférica en tubos Vacutainer K2E/K2 EDTA (BD Systems), posteriormente en condiciones de esterilidad se tomarán 50µL para el marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD8 FITC, anti-CD69 PE (BD Pharmingen, San José CA) y anti-CD57PerCP (Abcam, UK), se incubarán en obscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de esto se lisarán eritrocitos con 1mL de BD FACS Lysing solution (BD Biosciences, CA) por 10 minutos y se centrifugarán a 300 x g por 5 minutos, se decantará el sobrenadante, se resuspenderá el pellet y se agregarán 2mL de PBS 1X 0.5 Albúmina-1% Azida de Sodio (Santacruz Biotechnology, EUA). Nuevamente las células se centrifugarán a 300 x g por 5 minutos, se decantará el sobrenadante, se resuspenderá el pellet y se agregarán 2mL de PBS 1X +0.5 Albúmina-1% Azida de Sodio. Se procederá a su adquisición y lectura por citometría de flujo en un FACS Verse (BD Biosciences, CA), se compensará con CompBeads (BD, San José, CA.) sin marcar y marcadas con los respectivos anticuerpos. El análisis de los datos se hará con el programa FACSuite (BD Biosciences).

4. Separación de células T CD8+:

En condiciones de esterilidad se aislarán células T CD8+ de sangre periférica por selección negativa mediante RosetteSep™ CD8+ T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, VA, Canada). Para ello se agregarán 50µL del cocktail por 1mL de sangre y se incubarán por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se diluirá la muestra con PBS 1X+2%SBF y se mezclará gentilmente, después se decantará cuidadosamente la mezcla sobre Ficoll (Lymphoprep, StemCell Technologies), se centrifugará a 1200 x g por 20 minutos y se obtendrán las células T CD8+ enriquecidas, se lavarán con PBS 1X+2%SBF y se centrifugarán a 300 x g por 10 minutos, finalmente se eliminará el sobrenadante y se resuspenderá el pellet.

La cantidad de células y su viabilidad se determinará por azul de tripano. La viabilidad de las células en todos los experimentos deberá de ser >90%. También se determinará la pureza de la separación por selección negativa mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales anti-CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66, CD123 y TCRβγδ. El porcentaje de células CD8+ deberá ser >95%.

5. Cultivo y estimulación de células T CD8+:

Las células T CD8+ se sembrarán en placas de 96 pozos a 37°C, O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5% por duplicado en la concentración de 100 X 10<sup>3</sup> células/pozo. Se cultivarán por 12, 24 y 48 hrs. en medio RPMI 1640 (Gibco, invitrogen, N.Y. USA) con penicilina-estreptomicina-anfotericina y L-

glutamina al 3%, mezclada en la ausencia y presencia del Anticuerpo-Anti-TSHR (Abcam, UK) de 0.5, 1 y 2mg/mL.

#### 6. Detección de citocinas en sobrenadante

Se determinará del sobrenadante de cada pozo la concentración de Interferón-gamma (IFN-g), IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 e IP-10 por CBA (Cytometric Bead Array) con kits comerciales (BD, San José CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al final de procedimiento, los resultados se leerán con el citómetro FACSVerse (BD, San José, CA, USA). Los resultados se expresaron en pg/mL y se analizarán con el programa FCAP Array 3.0.

#### 7. Evaluación de la expresión de superficie de CD69 y CD57 e inducción del TSH-R en células T CD8+:

Las células T purificadas se recolectarán del cultivo, lavarán en PBS 1X +0.5 Albúmina-1% Azida de Sodio y posteriormente las células se marcarán con Anticuerpos anti-CD69PE, anti-CD57PerCP (mouse monoclonal; Abcam, UK), anti-TSH-R (mouse monoclonal; Abcam, UK) y se incubarán por 1hr. A temperatura ambiente, posteriormente se añadirá el anticuerpo secundario anti-mouse-APC (BioLegend), y se incubará por 30 minutos. La evaluación de la expresión de CD69, CD57 y TSH-R se realizará por citometría de flujo usando BD FACSVerse (BD Biosciences, San José, CA), se compensará con CompBeads (BD, San José, CA.) sin marcar y marcadas con los respectivos anticuerpos. El análisis de los datos se hará con el programa FACSuite (BD Biosciences).

Todos los resultados obtenidos se registrarán en una base de datos de Excel.

#### Población a estudiar:

Pacientes que fueron valorados por primera vez en la clínica de tiroides y que tengan algún dato de actividad de orbitopatía tiroidea.

#### Criterios de selección:

A. Pacientes con datos de orbitopatía tiroidea de nuevo diagnóstico con datos de actividad en su primera visita a la clínica de tiroides del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.

#### Criterios de Inclusión:

- A. Pacientes de cualquier edad.
- B. Con valoración por el servicio de clínica de tiroides.
- C. Que cuenten o requieran estudio de imagen (TC) como parte de su evaluación oftalmológica.
- D. Que acepten participar en el estudio y firmen la hoja de consentimiento informado (Apendice A)

#### Criterios de exclusión:

- A. Pacientes previamente tratados de la enfermedad tiroidea ocular.
- B. Pacientes sin datos de actividad.
- C. Pacientes que no cumplan con los criterios de inclusión.

#### Criterios de eliminación:

- A. Pacientes que no estén de acuerdo en participar en protocolo.
- B. Pacientes con alteraciones en biometría hemática

### Grupo control

- ✓ Se tomara grupo control pareado por edad y genero
- ✓ Misma cantidad de pacientes que grupo en estudio

### **9. Variables a estudiar:**

- A. Edad y sexo
- B. Clasificación de NO SPECS (Apéndice B).
- C. Predominio de afectación por tomografía
- D. Escala de actividad por CAS (Apéndice C)
- E. Escala de VISA (Apéndice D)
- F. Anticuerpos antitiroideos
  - a. Anticuerpo antitiroglobulina
  - b. Anticuerpo antiperoxidasa / Anticuerpo antimicrosomal
  - c. Anticuerpo anti-TSH
- G. Niveles de hormonas tiroideas

Variable	
Anticuerpos antitiroideos	Cuantitativa
Edad Y Sexo	Cuantitativa / cualitativa
NO SPECS	Cualitativa
VISA	Cualitativa
CAS	Cuantitativa
Hallazgos tomográficos	Cuantitativa

### **10. Análisis de resultados:**

El análisis estadístico se hará utilizando la prueba de ANNOVA, además se obtendrán los valores de media, moda y mediana para la determinación de la severidad clínica y se usará la prueba de Spearman para correlacionar la positividad de los anticuerpos con la actividad de la enfermedad y se tomará como significativa una  $p < 0.05$ .

#### 10. Cronograma de actividades:

Mes	Actividad	
Junio-Septiembre 2014	Realización del marco teórico	
Octubre 2014- Enero 2015	Se reclutaran pacientes de la clínica de tiroides y se recabarán los datos necesarios	
Enero 2015	Se realizará el análisis de los resultados y las pruebas estadísticas	
Febrero 2015- Marzo 2015	Se redactarán resultados, análisis y conclusiones	Se publicará en revista indexada

#### 11. Consideraciones éticas:

Este estudio no tiene implicaciones de riesgo para el paciente ya se evaluara clínicamente y se solicitaran estudios de laboratorio que son necesarios para su evaluación clínica y su seguimiento, de la misma muestra de sangre es de donde se hará la prueba de estimulación de linfocitos T in vitro

#### 12. Bioseguridad

Como parte del estudio se utilizara muestra de sangre del paciente. La cual será tomada posterior a la firma del consentimiento informado, con material estéril en el laboratorio del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, se centrifugará y se manipulará la muestra de acuerdo a lo descrito en material y métodos. El sobrante será desechado junto con los desechos biológico-infecciosos del hospital.

#### 13. Financiamiento de la Investigación.

Para la realización del estudio se requerirán los kits de elisa para el procesamiento de la muestra, los cuales ya se encuentran disponibles en el laboratorio del Instituto de Oftalmología Conde de valenciana

#### 14. Declaración de conflicto de intereses de los investigadores

No existe ningún interés comercial por parte de ninguno de los investigadores involucrados en el estudio.

## 15. Resultados

Se tuvieron 10 pacientes en el grupo control con promedio de edad , 8 femeninos y 2 masculinos con promedio de edad de 41.2 años (rango 27-62 años), el nivel promedio de anti-TG fue de 36.22 (rango de 15.75 a 103.4), el promedio de anti-TPO de 35.25 (rango de 11.92 a 97.89), el nivel promedio de TSH fue de 3.29 (rango de 0.007 a 16.5), el de T3 de 1.13 (rango de 0.27 a 1.53) y el promedio de T4 de 8.55 (rango de 4.12 a 10.72). A uno de estos pacientes se le hizo diagnóstico de hipotiroidismo secundario a autoinmunidad y se comenzó el tratamiento apropiado.

Se tuvieron 8 pacientes en el grupo de oftalmopatía sin datos de actividad, 6 de ellos mujeres, 2 hombres, el promedio de edad fue de 34.1 años (rango 14 a 58), el tiempo de evolución de la enfermedad fue de 8.9 años en promedio (rango de 0.8 a 29 años), el nivel de anti-TG promedio fue de 111.69 (rango de 17.34 a 488), nivel de anti-TPO de 141.8 (rango de 13 a 517.4), el nivel de TSH fue de 3.3 (rango 0.005 a 13.18), el nivel de T3 1.19 (rango de 0.942 a 1.5), el nivel de T4 de 10.88 (rango de 8.43 a 13.58), en escala de visa ninguno tuvo alteración en la visión, el promedio del puntaje de inflamación fue de 2 y 3 pacientes con datos de alteraciones en movilidad ocular, en cuanto a apariencia lo más común fue una oftalmopatía leve y el promedio de actividad por CAS es de 2, la presentación más frecuente por NO SPECS es de proptosis (clasificación 2), solo un paciente contaba con tomografía en la cual había aumento en el componente graso.

En el grupo de oftalmopatía tiroidea con datos de actividad se tuvieron a 11 pacientes, 2 de sexo masculino y 9 de sexo femenino, el promedio de edad fue de 51.27 años (rango de 27 a 64 años), tiempo promedio de evolución de 4 años (rango 0.2 a 18 años), nivel de anti-TG de 29.15 (rango 12.26 a 110.2), promedio anti-TPO 89.84 (rango 6.41 a 600), nivel TSH 9.04 (rango 0.005 a 58.26), nivel T3 1.47 (rango 0.565 a 3.37), nivel T4 10.44 (rango 4.91 a 20.59). Solo un paciente con alteración de la visión en la escala de VISA, el puntaje promedio de inflamación fue de 5 siendo el mínimo de 3 y el máximo de 5. El promedio de actividad de estrabismo fue de 2.3 con 3 pacientes sin mostrar datos de actividad y 6 de ellos con actividad mínima de 2 y máxima de 6 puntos; la apariencia más común en estos pacientes fue el daño moderado. El puntaje por CAS fue de 3.3 en promedio con mínimo de 3 y ninguno mayor de 4 puntos. La clasificación más común en NO SPECS fue el 4 que corresponde a la alteración en los movimientos oculares. 4 pacientes tenían engrosamiento muscular corroborado por tomografía y dos de ellos con aumento de volumen graso corroborado por tomografía, solo uno de ellos tenía ambos componentes. 7 pacientes de este grupo estaban con medicamentos para el control tiroideo, 3 de ellos con levotiroxina y 5 de ellos con antitiroideos, 2 de ellos habían recibido inmunosupresión, 1 de ellos por activación de la enfermedad y otro de ellos por datos de esclerodermia asociada.

## 16. Discusión

La edad entre el grupo control y el grupo de oftalmopatía con actividad es parecida, sin embargo, la edad de los pacientes del grupo de oftalmopatía sin actividad es menor, existe una marcada predominancia del sexo femenino en los tres grupos. El tiempo de evolución de la oftalmopatía es significativamente menor en el grupo con actividad. Los niveles de anticuerpos se encuentran más elevados en los pacientes con oftalmopatía dato que es esperable, sin embargo se encuentran aumentados en mayor proporción en el grupo sin datos de actividad que en el grupo con actividad clínica. El nivel de TSH es significativamente mayor en el grupo de pacientes con oftalmopatía tiroidea y datos de actividad que en los otros dos grupos. No hubo diferencia entre los niveles de T3 y T4 en los 3 grupos. Los datos de inflamación y de actividad en estrabismo fueron significativamente mayor en el grupo con actividad, así como la puntuación por CAS. Dentro de la

clasificación de No SPECS fue más común la alteración en la movilidad ocular en los pacientes con actividad y la proptosis en los pacientes con oftalmopatía sin actividad.

### **17. Conclusión**

La oftalmopatía tiroidea es una enfermedad más común en mujeres de edad media, que se puede tener una amplia variedad de presentaciones clínicas y alteraciones oculares tanto de superficie como alteraciones que pudieran afectar la visión. Los niveles de anticuerpos anti-TP y anti-TGO están significativamente aumentados en estos pacientes debido a la etiología autoinmune de la enfermedad y cuando se presenta con actividad es más común la afección a músculos extra-oculares, mientras que en pacientes inactivos aumenta la grasa periorbitaria.

### **18. Apéndices**

- A. Carta de consentimiento informado
- B. Clasificación NO SPECS
- C. Clasificación CAS
- D. Clasificación VISA
- E. Tabla de base de datos

APENDICE A.

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA\***

Título del protocolo: DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE AUTOANTICUERPOS TIROIDEOS Y PERFIL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CD8+ DE PACIENTES CON OFTALMOPATIA DISTIROIDEA EN FASE ACTIVA

Investigador Principal: Dra. Karen Janeth Arriozola Rodríguez, residente de segundo año del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Telefono: 811 077 9209

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 correlación del perfil de autoinmunidad con el tipo de presentación clínica, ya que existen diferentes tejidos oculares que se afectan en la orbitopatía distiroidea, algunas de las cuales no se han podido relacionar con el mecanismo fisiopatológico más común de la misma, además de diferenciar in vitro en las muestras de sangre en los pacientes con sintomatología a una subpoblación de linfocitos T que se cree que son los responsables de la casacada inflamatoria.

### **OBJETIVO DEL ESTUDIO**

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos. Determinar la correlación que existe entre la presentación clínica y el perfil de autoinmunidad en pacientes con orbitopatía tiroidea y estimular con anticuerpos anti-TSH la subpoblación de linfocitos responsables del cuadro fisiopatológico..

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 imagen (tomografía computada), 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 clínica de tiroides, 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 se ha relacionado específicamente el anticuerpo anti-TSH sin dar demasiada importancia a los otros dos anticuerpos que pueden estar elevados durante la enfermedad ni correlacionarnos con el cuadro clínico en pacientes con Orbitopatía de Graves, 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 el cuadro clínico se relaciona con el perfil de autoinmunidad 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**

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 publicados 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 apegó a ella.

**Firma del investigador:**

**Fecha:**

## APENDICE B

### CLASIFICACION NO SPECS

Clase 0: no signos ni síntomas

Clase 1: solo síntomas

Clase 2: Involucro de tejido blando (se correlaciona con atlas en color)

Clase 3: Proptosis. Se evalúa con exoftalmometría de Hertel.

Clase 4: involucro de la movilidad ocular, de acuerdo con el score de diplopia de Gorman

Clase 1: solamente signos: se tomara en cuenta la apertura palpebral (mm en posición primaria de la mirada)

Clase 5: involucro corneal

Clase 6: involucro del nervio óptico, con lámpara de hendidura, fundoscopia, prueba de visión al color y agudeza visual

## APENDICE C

### CLASIFICACION CAS

**Table 2: The 10 items of clinical activity score for graves orbitopathy**

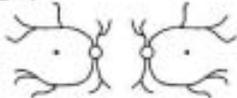
Pain	1	painful oppressive feeling on or behind the globe , during the last 4 weeks
	2	pain on attempted up, side or down gaze during the last 4 weeks
Redness	3	redness of the eyelid(s)
	4	diffuse redness of the conjunctiva ,covering at least one quadrant
Swelling	5	swelling of the eyelid(s)
	6	chemosis
	7	swollen caruncle
	8	Increase of proptosis of $\geq 2$ mm during a period of 1-3 months
Impaired function	9	Decrease of eye movements in any direction $\geq 50$ during a period of 1-3 months
	10	Decrease of visual activity of $\geq 1$ line(s) on the snellen chart (using a pinhole) during a period of 1-3 months

For each item present, 1 point is given. The sum of these points is the clinical activity score

APENDICE D- CLASIFICACION VISA

<b>VISA CLASSIFICATION:</b>				<b>Patient Label:</b>
Date:	Visit #:			
<b>ORBITOPATHY</b>	<b>THYROID</b>			
Time since onset:	Time since onset:			
Progress:	Progress:			
Tempo:	Status:			
Symptoms:	Symptoms:			
Therapy:	Anti-thyroid meds:	<b>GENERAL</b>		
	Radioactive iodine:	Smoking:		
		Family Hx:		
		Medical Hx:		
		Allergies:		
		Meds:		

SUBJECTIVE	OBJECTIVE	OD	OS	
<b>VISION</b>				<b>Refractions</b>
Vision: n / abn	Central vision: sc / cc / ph with manifest	20/____ 20/____	20/____ 20/____	Wearing _____ + _____ X _____ _____ + _____ X _____ Manifest _____ + _____ X _____ _____ + _____ X _____
Color vis: n / abn	Color vision errors (AO) Pupils (afferent defect)	y / n	y / n	Normal <4 
Fundus	Optic nerve: Edema Pallor	y / n y / n	y / n y / n	
Progress: s / b / w				
<b>INFLAMMATORY</b>				<b>Inflammatory Index (worst eye/eyelid)</b>
Retrobulbar ache At rest (0-1) With gaze (0-1) Lid swelling AM: y / n	Chemosis (0-2) Conjunctival injection (0-1) Lid injection (0-1) Lid edema Upper (0-2) Lower (0-2)			Chemosis (0-2): Conjunctival injection (0-1): Lid injection (0-1): Lid edema (0-2): Retrobulbar ache (0-2): <b>Total (8):</b>
Progress: s / b / w				
<b>STRABISMUS/ MOTILITY</b>				<b>Prism Measure:</b>
Diplopia: None (0) With gaze (1) Intermittent (2) Constant (3) Head turn: y / n	Ductions (degrees):  Restriction > 45° 30-45° 15-30° < 15°	+  0 1 2 3	+  0 1 2 3	
Progress: s / b / w				
<b>APPEARANCE/ EXPOSURE</b>				<b>Fat prolapse and eyelid position:</b>
Lid retraction y / n	Lid retraction (upper): MRD-4 (lower scleral show): Levator function Lagophthalmos Exophthalmometry (Hertel)	mm mm mm mm mm	mm mm mm mm mm	
Proptosis y / n	Corneal erosions	y / n	y / n	<b>Base:</b>
Tearing y / n	Corneal ulcers	y / n	y / n	
FB Sensation y / n	IOP -straight -up	mmHg mmHg	mmHg mmHg	
Progress: s / b / w				
<b>DISEASE GRADING</b>		<b>Grade</b>		<b>Progress / Response</b>
V (optic neuropathy)		y / n		s / b / w
I (inflammation) 0-8		/ 8		s / b / w
S (strabismus) 0-3		/ 3		s / b / w
(restriction) 0-3		/ 3		s / b / w
A (appearance/exposure)		mild / mod / severe		s / b / w

<b>MANAGEMENT</b>	<b>FOLLOW-UP INTERVAL:</b>
-------------------	----------------------------

**Apendice E. Base de datos protocolo Oftalmopatía Tiroidea**

	Sexo	Edad	Tiempo evolución (años)	anti-TG	anti-TPO	anti-TSH	TSH	T3	T4	VISA				NO SPEC	TAC	Tratamiento
										V	I	S	A			
<b>Grupo Control</b>																
BGG	F	50		23.9 2	26.3 4		1.79	1.32	9.59							
RMCT	F	40		20.8 2	20.2 8		4.26	1.27	8.54							
DPH	F	27		18.6 5	15.5		1.21	1.15	9							
DCF	F	29		28.8 6	27.8 3		1.39	1.34	9.6							
GGV	M	49		16.7	87.5 3		0.00 7	0.27	4.12							
MMM M	F	62		15.7 5	11.9 2		2.97	0.96	6.37							
ABB	<b>F</b>	<b>41</b>		19.6 1	12.6 9		1.02	1.02	8.18							
RLGR	<b>M</b>	<b>52</b>		87.6	97.8 9		1.81	1.53	10.7 2							
POA	<b>F</b>	<b>41</b>		26.9 2	34.0 6		2.04	1.25	9.92							
BJU	F	30		103. 4	18.5 3		16.5	1.27	9.54							



Grupo con orbitopatía con actividad																	
ATM	F	55	18	12.26	11.06	58.26	0.565	4.91	0	5	0	2	3	3	1	0	
DNSC	F	27	7	15.75	47.37	10.97	0.94	10.73	0	4	0	2	4	2		1	levotiroxina
EVR	F	71	0.2	19.57	11.57	0.022	1.2	12.16	1	4	5	2	3	4	2	1	tapazol
GRF	F	60	1.2						0	3	0	1	3	2		1	tapazol
MMP	M	50	1	17.43	13.79	5.28	1.3	7.73	0	4	3	2	3	4	2		
YHT	F	46	0.8	19.29	35.78	5.08	0.867	12.64	0	5	2	3	4	3,4		1	levotiroxina
CNC	F	57	7	18.64	6.41	1.82	1.14	8.74	0	3	3	1	3	4	1/2/2015	1	tiamazol
MDP				26.14	24.92	0.005	3.37	10.78									
MLDH	F	64	1.2	23.08	57.72	4.72	1.17	10.09	0	4	6	3	3	4	2	1	tiamazol, levotiroxina
JMRA						4.29	1.06	6.04									
ODV	F	36	0.3	110.2	600	0.006	3.09	20.59	0	4	2	2	4	3		1	tiamazol

## Bibliografia:

1. Bartalena L, Tanda ML. Clinical practice. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 360: 994-1001, 2009.
2. Menconi F, Marcocci C, Marinò M. Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):398-402.
3. Hiromatsu Y, Eguchi H, Tani J, Kasaoka M, Teshima Y. Graves' ophthalmopathy: epidemiology and natural history. *Intern Med.* 2014;53(5):353-60
4. Regensburg NI, Wiersinga WM, Berendschot TT, Potgieser P, Mourits MP. Do subtypes of graves' orbitopathy exist? *Ophthalmology.* 2011 Jan;118(1):191-6
5. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev* 2000;21(2):168–99.
6. Bartley GB, Fatourech V, Kadrmas EF, et al. Clinical features of Graves' ophthalmopathy in an incidence cohort. *Am J Ophthalmol* 121: 284-290, 1996
7. Hiromatsu Y, Eguchi H, Tani J, Kasaoka M, Teshima Y. Graves' ophthalmopathy: epidemiology and natural history. *Intern Med.* 2014;53(5):353-60
8. Akamizu T, Mori T, Nakao K. Pathogenesis of Graves' disease: molecular analysis of antithyrotropin antibodies. *Endocrine Journal.* 1997; 44:633–646
9. Gorman, C.A. (1994) Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*, 4 , 379–383
10. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 362: 726-738, 2010
11. Gerding MN, van der Meer JW, Broenink M, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF. Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Mar;52(3):267-7
12. Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, Matheis N, Kohn LD, Kahaly GJ. A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 May;95(5):2123-31
13. McKenzie, J.M. & McCullagh, E.P. (1968) Observation against a causal relationship between the long-acting thyroid stimulator and ophthalmopathy in Graves' disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 28, 1177±1182.
14. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(1):90–7
15. Goh SY, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Khoo DH. Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves' disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 May;60(5):600-7
16. Farid M, Roch-Levecq AC, Levi L, Brody BL, Granet DB, Kikkawa DO. Psychological disturbance in graves ophthalmopathy. *Arch Ophthalmol.* 2005 Apr;123(4):491-6
17. Wang Y, Smith TJ. Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Mar 20;55(3):1735-48
18. Förster G, Otto E, Hansen C, Ochs K, Kahaly G. Analysis of orbital T cells in thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jun;112(3):427-34
19. Tötterman TH, Andersson LC, Häyry P. Evidence for thyroid antigen-reactive T lymphocytes infiltrating the thyroid gland in Graves' disease. *Clin Endocrinol(Oxf).* 1979 Jul;11(1):59-68
20. Aniszewski JP, Valyasevi RW, Bahn RS. Relationship between disease duration and predominant orbital T cell subset in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Feb;85(2):776-80

- 20b. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *TRENDS Immunol.* 2005; 26: 136-140.
- 20c. Monier S, Pilling D, Reme T, Salmon M. CD57+ T Lymphocytes are derived from CD57-precursors by differentiation occurring in late immune response. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 1503-1511.
21. Saitoh O, Abiru N, Nakahara M, Nagayama Y. CD8+CD122+ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model. *Endocrinology.* 2007 Dec;148(12):6040-6
22. Salazar, Maria Sandra. Tesis 2014. CONVAL. Pendiente publicación
23. Werner SC 1977 Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab* 44:203–204.
24. Pinchera, A., Wiersinga, W., Glinoeer, D., Kendall-Taylor, P., Koornneef, L., Marcocci, C., Schleusener, H., Romaldini, J., Niepominiscze, H., Nagataki, S., Izumi, M., Inoue, Y., Stockigt, J., Wall, J.R., Greenspan, F., Solomon, D., Garrity, J. & Gorman, C.A. (1992) Classification of eye changes of Graves' disease. *Thyroid*, 2, 235–236.
25. Dolman PJ, Rootman J. VISA Classification for Graves orbitopathy. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2006 Sep-Oct;22(5):319-24
26. Weber AL, Dallow RL, Sabates NR. Graves' disease of the orbit. *Neuroimaging Clin N Am.* 1996 Feb;6(1):61-72