

**RESPUESTA DE CÉLULAS T COCULTIVADAS CON CELULAS
MESENQUIMALES FRENTE A MITOGENOS Y ALOANTIGENOS EN
PACIENTES COLOMBIANOS CON ESCLERODERMIA**

**AUTOR
KRISTEL JULHIE HURTADO OBREGÓN**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de:**

BACTERIOLOGÍA

LUZ MABEL AVILA BCI. MSc. PhD © Director

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ; ENERO DE 2009**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Este trabajo esta dedicado en primera instancia a Dios y a mi madre; los cuales siempre y en todo momento me dieron las fuerzas y el aliento para continuar adelante.

KRISTEL HURTADO

AGRADECIMENTOS

A Dios por culminar con éxito este trabajo.

A mi Directora de Proyecto de Grado la Dra. Luz Mabel Ávila Portillo; por su entrega, paciencia y comprensión.

Al Banco de Células Stem de Colombia y laboratorio de inmunología especial- Servicio de Reumatología del Hospital Militar Central, por su entera colaboración en el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Grajales de Saludcoop (Especialista Hematología) por su colaboración en toma de muestras de Medula ósea.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	16
II. MARCO TEÓRICO	18
1. ESCLERODERMA	18
1.1. <u>Presentación Clínica</u>	18
1.1.1 Escleroderma localizada	18
1.1.2 Esclerosis Sistémica	18
1.2 <u>Fisiopatología</u>	19
1.2.1 Disfunción Vasular	19
1.2.2 Activación Inmune	21
1.2.2.1 Inmunidad Adaptativa	22
1.2.2.1.1 Linfocito T	22
1.2.2.1.1.1 Citoquinas / LTh2	22
1.2.2.1.1.2 Citoquinas / LTh1	23
1.2.2.1.2.3 Activación LT	24
1.2.2.1.2 Linfocito B	24
1.2.2.2 Inmunidad Innata	26
1.2.2.2.1 Células NK	26
1.2.2.2.2 Células NKT	26
1.2.2.2.3 Moléculas	26
1.2.3 Depósitos de proteínas de Matriz Extracelular	27
1.2.3.1 Fibroblasto	29
2. CÉLULAS MADRE	29
2.1. <u>Generalidades</u>	29
2.2. <u>Células Madres Embrionárias</u>	30
2.3. <u>Células Madre Adultas</u>	30

2.4 <u>Células Madre Hematopoyéticas</u>	31
2.5 <u>Células Madre Mesenquimales</u>	32
2.5.1 Generalidades	32
2.5.2 Acción Regulatoria	34
2.5.3 Mecanismo Inmunomodulador	34
2.5.3.1 Efectos MSC sobre LT	35
2.5.3.2 Efectos MSC sobre LB	38
2.5.3.3 Efectos MSC sobre NK	38
2.5.3.4 Efectos MSC sobre CPA	39
3. APLICACIÓN	40
3.1. <u>Antecedentes</u>	40
3.2. <u>Aplicación Trasplante Autólogo en Enfermedades Autoinmunes</u>	42
3.3. <u>Grupos Especializados en Esclerosis Sistémica</u>	42
3.3.1 <i>ASTIS</i>	42
3.3.1.1 Criterios de Elección	43
3.3.1.1.1 Inclusión	43
3.3.1.1.2 Exclusión	44
3.3.1.2 Estudio Clínico	45
3.3.1.3 Resultados	46
3.3.2 <i>SCOT</i>	47
3.3.2.1 Criterios de Elección	47
3.3.2.1.1 Inclusión	47
3.3.2.1.2 Exclusión	48
3.3.2.2 Estudio clínico	48
3.3.2.3 Resultados	49
3.3.3 <i>JAPONESES</i>	50
3.3.3.1 Estudio Clínico	50
3.3.3.2 Resultados	50
3.3.4 OTROS	50
3.4 HSCT, MSC Y ESCLERODERMA	52

3.5	HLA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES	54
4.	LABORATORIO	54
4.1	<u>Cultivo Celular</u>	54
4.2	<u>Tripsinización</u>	55
4.3	<u>Cultivo Mixto de Linfocitos (CML)</u>	55
4.4	<u>Radiación Ionizante</u>	55
4.5	<u>Medición de Linfoproliferación</u>	56
4.5.1	Técnica ALAMAR BLUE	56
4.6	<u>Ensayo de Blastogénesis</u>	56
4.6.1	Mitógenos	57
4.7	<u>Criopreservación Celular</u>	57
III.	FORMULACION DE PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	58
5.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	58
5.1.	<u>Formulación del problema</u>	58
5.2.	<u>Justificación</u>	59
6.	OBJETIVOS	60
6.1	<u>Objetivo General</u>	60
6.2	<u>Objetivos Específicos</u>	60
7.	HIPOTESIS	61
IV.	DISEÑO METODOLOGICO	62
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	62
8.1	<u>Diseño de la Investigación</u>	62
8.2.	<u>Población del Estudio</u>	62

8.3	<u>Criterios de Elección de Muestras</u>	63
8.3.1	Obtención MSC	63
8.3.2	Obtención CMN	63
8.4	<u>Variables del Estudio</u>	64
9.	MEDICIONES E INSTRUMENTOS	64
9.1.	<u>Esquema de Trabajo</u>	64
9.2.	<u>Reactivos y Técnicas</u>	65
9.2.1	Suplementos	65
9.2.1.1	Medio de Cultivo DMEM-LG	65
9.2.1.1.1	Equipos y Materiales	65
9.2.1.1.2	Reactivos	65
9.2.1.1.3	Preparación del medio de cultivo DMEM-LG	65
9.2.1.2	Medio DMEM-LG suplementado LPRP al 10%	66
9.2.1.2.1	Equipos y Materiales	66
9.2.1.2.2	Reactivos	66
9.2.1.2.3	Preparación de LPRP	66
9.2.1.2.4	Preparación de Medio DMEM-LG suplementado con LPRP al 10%	66
9.2.1.3	Medio de Cultivo RPMI II para Linfocitos	67
9.2.1.3.1	Equipos y Materiales	67
9.2.1.3.2	Reactivos	67
9.2.1.3.3	Preparación de Medio RPMI II	67
9.2.1.3.4	Preparación de Medio RPMI II suplementado con LPRP al 10%.	68
9.2.2	Protocolos	68
9.2.2.1	Aislamiento de MSC y Cultivo Celular de CMN provenientes de Medula Ósea.	68
9.2.2.1.1	Equipos y Materiales	68
9.2.2.1.2	Reactivos	68
9.2.2.1.3	Aislamiento de CMN de Médula Ósea	69
9.2.2.1.4	Cultivo de CMN (Células Mesenquimales)	69

9.2.2.2	Disociación Enzimática (Tripsinización)	70
9.2.2.2.1	Equipos y Materiales	70
9.2.2.2.2	Reactivos	70
9.2.2.2.3	Protocolo de Tripsinización	70
9.2.2.3	Caracterización Fenotípica de MSC	71
9.2.2.3.1	Protocolo de Caracterización de MSC	71
9.2.2.4	Aislamiento de CMN de Sangre Periférica	71
9.2.2.4.1	Equipos y Materiales	71
9.2.2.4.2	Reactivos	72
9.2.2.4.3	Aislamiento de CMN de Sangre Periférica	72
9.2.2.5	Criopreservación Celular	72
9.2.2.5.1	Equipos y Materiales	72
9.2.2.5.2	Reactivos	72
9.2.2.5.3	Protocolo de Criopreservación Celular	73
9.2.2.6	IFI / ELISAS	74
9.2.2.6.1	ANAS- IFI / Hep 2000	74
9.2.2.6.1.1	Equipos y Materiales	74
9.2.2.6.1.2	Reactivos	74
9.2.2.6.1.3	Procedimiento y Montaje	74
9.2.2.6.2	ELISA – ENAS/ BINDAZYME™	75
9.2.2.6.2.1	Equipos y Materiales	75
9.2.2.6.2.2	Reactivos	75
9.2.2.6.2.3	Procedimiento ENAS	76
9.2.2.7	Tipificación de HLA por PCR	76
9.2.2.7.1	Materiales y Equipos	77
9.2.2.7.2	Reactivos	77

9.2.2.7.3	Extracción de DNA	77
9.2.2.7.4	Amplificación de DNA	78
9.2.2.7.5	Corrido Electroforético e Interpretación	78
9.2.2.8	Cultivo Mixto de Linfocitos	79
9.2.2.8.1	Materiales y Equipos	79
9.2.2.8.2	Reactivos	79
9.2.2.8.3	Aislamiento de CMN	79
9.2.2.8.4	Selección de Parejas de Linfocitos T alogénicos	79
9.2.2.8.5	Irradiación Celular	79
9.2.2.8.6	Co-cultivo de Células	80
9.2.2.9	Ensayo de Blastogénesis	81
9.2.2.9.1	Materiales y Equipos	81
9.2.2.9.2	Reactivos	81
9.2.2.9.3	Protocolo de Ensayo de Blastogénesis	81
9.2.2.10	Análisis cuantitativo de Viabilidad y Proliferación Celular	82
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	84
	10. RESULTADOS	84
	11. DISCUSIÓN	95
VI.	CONCLUSIONES	99
	12. CONCLUSIONES	99
	13. RECOMENDACIONES	100
	BIBLIOGRAFIA	101

ANEXOS	124
Anexo A Consentimiento Informado	124
Anexo B Resultados HLA (Parte I)	130
Tabla 1.a Frecuencias HLA-A	130
Tabla 1.b Frecuencias HLA-B	130
Tabla 1.c Frecuencias HLA-DR	131
Tabla 2.a Agrupación de Datos HLA-A	132
Tabla 2.b Agrupación de Datos HLA-B	132
Tabla 2.c Agrupación de Datos HLA-DR	133
Anexo C Resultados Serológicos	134
Tabla 3.a Estadísticos ENAS, Sci70, ACAS y APL	134
Tabla 3.b Frecuencia de Positividad en Exámenes Serológicos	134
Anexo D Resultados HLA (Parte II)	135
Tabla 4.a Asociación HLA-A y Positividad de Exámenes.	135
Tabla 4.b Asociación HLA-A y Positividad de Exámenes.	135
Tabla 4.c Asociación HLA-A y Positividad de Exámenes.	135
Anexo E Curva de Calibración Alamar Blue.	136
Anexo F Modelo de Siembra en Microplaca de 96 pozos.	137

RESUMEN

Las opciones terapéuticas disponibles en pacientes con Esclerosis Sistémica (SSc) de mal pronóstico son limitadas, adicionalmente las recientes aproximaciones terapéuticas disponibles son costosas y ninguno de los agentes biológicos de nueva generación tiene suficiente soporte científico para ser recomendado. En este contexto el uso del autotransplante de células progenitoras hematopoyéticas (HSCT) ha sido sugerido y aceptado en enfermedades autoinmunes (AD) ya que se ha observado como esté logra remisión de la enfermedad por largos periodos de tiempo; debido a su factibilidad y confiabilidad. En los últimos años con el estudio de la célula madre; se ha visualizado el papel que poseen las Células Madre Mesenquimales (MSCs) en el reajuste de la tolerancia inmunológica en pacientes con AD, por lo tanto el uso conjunto de HSCT/MSC sería la alternativa terapéutica por excelencia en pacientes refractarios a tratamiento convencional. En este estudio se demuestra el potencial inmunomodulador de la MSC in vitro tanto de individuos sanos como de pacientes con SSc en proporciones 1:1 y 1:10 de MSC/CMN sobre la actividad proliferativa de linfocitos T de pacientes colombianos con SSc frente a Fitohemaglutinina y células alógenicas de diferente HLA al día 5° de cultivo; de igual forma se halló asociación estadísticamente significativa entre HLA-DR11 y SSc [$pF=0.025^*$ (0.239); $p < 0.05$], en pacientes colombianos provenientes del altiplano Cundí-boyacense.

PALABRAS CLAVE: Esclerosis Sistémica (SSc), HLA, HSCT, MSC, Mitógenos, Aloreactividad.

ABSTRACT

The available treatment options for patients with systemic sclerosis (SSc) with a poor prognosis are limited. Besides, the recent therapeutic approaches available are expensive and none of the new generation of biological agents have enough scientific support to be recommended. In this context the use of the autologous haematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) has been suggested and accepted in autoimmune disease (AD) has been achieved remission of the disease for long periods of time. In recent years the study of stem cells with mesenchymal stem cells (MSCs) has been the readjustment of immunological tolerance in patients with AD; hence the use of HSCT / MSC would be excellent therapeutic alternative for patients refractory to conventional treatment. This study demonstrates the

potential immunomodulator of MSC in vitro both healthy subjects and patients with SSc in proportions of 1:1 and 1:10 MSC / MNCs on the proliferative activity of T cells from patients with Colombian SSc against Phytohemagglutinin and allogeneic cells of different HLA 5th day of culture, just as it was found statistically significant association between HLA-DR11 and SSC [$p = 0.025$ * (0239), $p < 0.05$] in patients from the Colombian highlands Cundi-boyacense immunology in patients with AD.

KEYS WORDS: Systemic sclerosis (SSc), HLA, HSCT, Mitogens, Allogeneic Cells.

I. INTRODUCCION

En la actualidad el manejo e instauración de nuevas terapias para las enfermedades de etiología autoinmune se ha convertido en una de las áreas de la salud con mayor número de investigaciones a nivel mundial, debido al que el 3-8 % de la población en general las padece. Los esfuerzos realizados para comprender la fisiopatología de dichas enfermedades parecen ser esquivos ante una comunidad científica sedienta de respuestas.

El tratamiento de elección para estas patologías habitualmente radica en la administración de corticoides, esteroides, anti-malaricos, anti-inflamatorios e inmunosupresores. Este tipo de tratamiento es efectivo en la mayoría de los pacientes, pero el aumento creciente de pacientes refractarios a tratamientos convencionales ha obligado a implementar nuevas tecnologías y a aplicar conocimientos que en su momento parecían etéreos y lejanos. De aquí surgió el empleo del Trasplante de células madre hematopoyéticas en el control de pacientes con enfermedades autoinmunes refractarias a tratamiento.

A mediados de 1996 se pensó como tal en una terapéutica basada en células madres; fue así como el grupo del Dr. Alan Tyndall del instituto Bassel de Suiza y un equipo europeo multicéntrico iniciaron una terapia opcional que ayude a eliminar las clonas auto-reactivas asociadas a la enfermedad conjunta con re-educación del sistema inmune del paciente; las principales enfermedades sometidas a estudio son Esclerosis Sistémica, Esclerosis Múltiple, Artritis, Lupus Eritematoso Sistémico. Esta terapéutica involucra protocolos de movilización de células madre hematopoyéticas, leucoferésis, mieloablación, selección y reinfusión.

En la actualidad el empleo de células madre hematopoyéticas (HSCs) logra estabilización de la enfermedad con periodos libre de medicamentos mejorando directamente la calidad de vida de los pacientes. Recientes estudios citan las propiedades de las células stem mesenquimales (MSCs) derivadas de medula ósea en la inhibición de la respuesta y activación de las células T inducida por mitógenos y aloantígenos, por lo cual el uso conjunto de HSCs y MSCs ampliarían los efectos del trasplante de células stem hematopoyéticas en pacientes refractarios. Esto se ha demostrado por medio de ensayos In vitro, en los que las MSCs no inducen la proliferación de linfocitos aun cuando existan en el medio señales coestimuladoras de activación. El mecanismo exacto por el cual las

células MSCs intervienen en la proliferación de las Linfocitos T aun se halla desconocido. En este estudio, se presentan los resultados comparativos de la respuesta de linfocitos T de pacientes colombianos con Esclerosis Sistémica Vs controles sanos provenientes del altiplano cundí-boyacense en presencia o ausencia de MSC frente a mitógenos y aloantígenos. Además se hace un estudio de asociación entre el sistema HLA, presencia de la enfermedad y producción de auto anticuerpos.

II MARCO TEORICO

1. ESCLERODERMA

La Escleroderma es una enfermedad autoinmune generalizada del tejido conectivo de etiología desconocida. Esta enfermedad autoinmunitaria compleja se caracteriza por presentar conjuntamente 3 patologías: Disfunción Vasculo-Endotelial; Activación inmune descontrolada y Depósito de componentes propios de la Matriz Extracelular (208). La incidencia estimada de esta enfermedad en Estados Unidos corresponde a 18 a 20 casos por millón por año (135), con un prevalencia aproximada de 26/100.000 por año, afectando predominantemente a mujeres con una relación de 3:1, la cual aumenta a 7:1 en grupos más jóvenes

La enfermedad comprende un amplio compromiso del sistema tegumentario caracterizado por engrosamiento y fibrosis de la piel así como la fibrosis de órganos viscerales "Pulmón, Corazón, Tracto gastrointestinal y Riñón":

Actualmente la Escleroderma se encuentra clasificada en 2 grandes grupos: Escleroderma localizada y Esclerosis Sistémica

1.1 Presentación Clínica:

1.1.1 Escleroderma Localizada:

Este grupo a su vez esta conformado por 4 diferentes subtipos basados en la presentación clínica y morfología: Placa/Morfea, Bulbar, Lineal y Profunda. Usualmente se caracteriza por hallarse confinada a piel y en menos frecuencia a músculo; afectando principalmente a infantes y jóvenes. Las presentaciones más habituales de Escleroderma Localizada son la Morfea y Lineal (155) .Es posible desarrollar la forma generalizada de la enfermedad después de sufrir la forma localizada, pero no es lo más frecuente. La Esclerodermia Lineal puede afectar tejido subyacente. También se observan a menudo remisiones espontáneas de la Esclerodermia localizada, después de una larga evolución.

1.1.2 Esclerosis Sistémica:

La Esclerosis Sistémica (ES) se halla clasificada en tres subgrupos: Esclerosis Sistémica Limitada, Esclerosis Sistémica Difusa y Síndrome de solapamiento con otras enfermedades autoinmunes.

Esclerosis Sistémica Limitada: Existe engrosamiento cutáneo, distal, simétrico de los dedos, antebrazos, piernas, cara y cuello, compromiso visceral tardío con hipertensión pulmonar, asociada a anticuerpos anti-centrómero. Relativamente de buen pronóstico. (54)

Esclerosis Sistémica Difusa: Prevalece el engrosamiento dérmico proximal que afecta cara, cuello, tronco y de manera simétrica dedos, manos, brazos y piernas. Es de inicio rápido, con compromiso visceral significativo (pulmonar, gastrointestinal o renal), asociada a anticuerpos anti-topoisomerasa I (Anti Scl-70). Este tipo es de curso variable globalmente de mal pronóstico. (54)

Síndrome de Solapamiento: Existencia de Esclerosis limitada o difusa con una o varias otras enfermedades de tejido conectivo (155).

1.2 Fisiopatología:

La mayoría de los estudios realizados sobre la patogénesis de la Escleroderma han estado enfocados en principio a entender los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la Esclerosis Sistémica (SSc); que involucra disfunción vascular, activación inmune y fibrosis. En dichos estudios se ha observado una posible asociación entre factores exógenos, factores genéticos y el sistema inmune.

Entre los factores de riesgo externos predisponentes SSc se hallan; sílica cristalina, solventes de cloro, vapores de soldar entre otros; a su vez se han mencionado factores exógenos asociados con la severidad de enfermedad como resinas de epoxi, polvo de sílice y solventes aromáticos. (52,128)

1.2.1 Disfunción Vascular: El daño vascular se caracteriza por vasoespasmo arterial, hiperactividad del músculo liso y proliferación intimal llevando finalmente a oclusión, clínicamente se caracteriza por cambios en la estructura de los capilares, telangiectasias, fenómeno de Raynaud, úlceras digitales, hipertensión arterial e isquemia tisular (39). Los estudios Microscópicos e Histoquímicos realizadas a las muestra de biopsias de piel de los pacientes con ES indican que las lesiones patológicas en la piel muestran cambios en la

función y estructura a nivel microvascular de las Células Endoteliales, originado por infiltración de células inflamatorias y daño endotelial progresivo; este daño endotelial es evidenciado por la reducción en el número de capilares, engrosamiento de las paredes alveolares ligado a fibrosis y proliferación de la intima “*Pacientes en estadios tempranos de la enfermedad*” desembocando en daño directo sobre los mecanismos vasoreguladores (Vasodilatación/Vasoconstricción) (208).

El compromiso vascular en pacientes con Ssc es de gran prevalencia, la Hipertension Arterial Pulmonar (PAH) es la principal complicacion vascular presentandose en 10% de pacientes. Aqui los moduladores del tono arterial y la remodelación ocasionan PAH por lo cual los genes que les codifican son candidatos en la patogénesis vascular de la enfermedad. Entre ellos se encuentran Receptor tipo 2 de Proteína morfogénica de Hueso, Endoglina, Oxido Nítrico Sintetasa; Endotelina-1, Enzima convertidora de Angiotensina-I y Factor de Crecimiento Vascular endotelial. (10, 63)

- Receptor tipo 2 de Proteína morfogénica de Hueso (BMPR2) pertenece a la superfamilia de receptores del TGF- β ; este receptor posee en su dominio intracelular actividad tirosina quinasa, mutaciones en este dominio estarían ligadas a herencia familiar o esporádica de PHA; en cohortes de pacientes con SSc y PHA, el gen que codifica BMPR2 (2q33eq34) no presenta alteración específicas para la enfermedad. (137, 186).
- Endoglina (CD 105/ENG) es un co-receptor del TGF- β involucrado en orientar la señalización intracelular en las células endoteliales que van a entrar en mitosis por lo que parece estar implicada en procesos de angiogénesis. Mutaciones en el entrón 7 del gen ENG ubicado en la posición 9q33eq34 están relacionadas con la enfermedad de Osler, aneurismas intracerebrales y en menor proporción con PHA en SSc (204).
- Oxido Nítrico Sintetasa (NOS) produce oxido nitrico; el NO es un gas incoloro que participa en varias funciones biológicas incluyendo neurotransmisión, vasodilatación, inmunotoxicidad y transducción de señales; igualmente regula la adhesión de polimorfonucleares y contribuye al mantenimiento de la integridad de la barrera microvascular mediante mecanismos que disminuyen la permeabilidad vascular, la inflamación y la formación de edema. Se ha asociado alteraciones polimórficas en la

secuencia promotor de NOS2 (Isoforma inducible NO sintetasa) ubicadas en la posición 17q11eq12 en pacientes con SSc (98).

- Enzima Convertidora de Angiotensina-I (ACE); el sistema renina angiotensina esta íntimamente relacionada con la regulación vasoactiva por medio de la enzima ACE. Algunos pacientes con SSc presentan niveles elevados de ACE en sangre agravando el compromiso vascular del paciente; el polimorfismo asociado se evidencia en el intrón 16 del gen que le codifica, por inserción o delección de nucleótidos. (55, 17)

- Endotelina (ET-1): Es un potente vasoconstrictor de efecto autocrino y paracrino sintetizada en endotelio y musculo liso vascular, su función esta mediada por dos clases de receptores pertenecientes a la superfamilia de Receptores asociados a proteína G (EDNRA and EDNRB). El rol fisiológico de la ET-1 es realizar vasoconstricción, promover la inflamación, fibrosis y proliferación celular. Alteraciones del gen EDNRB por SNPs en el exón 3 (-2446 C/A; -2547 A/G) y exón 2 (+2841 G/A) están asociados con SSc difusa; alteraciones SNPs en el gen del EDNRA en exón 6 (+69 C/T; +105 A/G) están asociados con la presencia de autoanticuerpos contra RNA polimerasa. (58)

- Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), Es una citoquina que induce la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células endoteliales en SSc, se han observado altas niveles de VEGF. Aun no existe asociación polimórfica relacionada con SSc (10).

1.2.2 Activación Inmune: En SSc existe activación de Sistema Inmune Innato y Adaptativo. En biopsias de piel de pacientes con escleroderma se evidencia infiltración y activación leucocitaria con predominio de Linfocitos T y sobreexpresión de moléculas de adhesión. Es claro que algunas citoquinas y factores de crecimiento (TGF- β , IL-4, IL-10 e INF- γ) juegan un rol importante en la patogénesis de SSc por lo que se estudiara el papel de cada una de estas, las características de las células inmunitarias (LT, LB, NK) y su interacción con células fibroblásticas y endoteliales (133).

En las ultimas investigaciones se notó la existencia de un desbalance en el fenotipo celular de las células T-Helper, resultando así en la elevación del radio entre TH2 y TH1: TH 2 > TH 1 (155, 15). Las células Helper Th2 juegan un rol importante ya que sus citoquinas

promueven la fibrosis tisular. Muchos de los pacientes con Esclerodermia tanto localizada como sistémica presentan un aumento elevado del antígeno de superficie específico de linfocitos TH2; CD 30 (85). En términos generales existe mayor proporción en LT CD4+ TH2 en relación a CD4+ TH1 y CD8+.

1.2.2.1 Inmunidad Adaptativa

1.2.2.1.1 Linfocito T:

El perfil de citoquinas en SSc está determinado por el balance existente entre Linfocitos TH1/TH2; en contexto general los linfocitos TH1 secretan IFN- γ , IL-2 y TNF- α las cuales promueven la inmunidad mediada por células y algunas vías antifibróticas; por el contrario los linfocitos TH2 promueven la inmunidad humoral mediante la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13, algunas de estas citoquinas tienen gran capacidad pro-inflamatoria y profibrótica. De esta manera el aumento de la población TH2 sobre TH1 induce fibrosis y producción de anticuerpos en pacientes con SSc. (50, 207)

El mecanismo de acción de las citoquinas en la SSc juegan un rol importante en la instauración y desarrollo de la enfermedad; visto de esta manera se citarán las principales funciones de cada una de ellas para entender así los efectos generados por el desbalance de linfocitos TH1/TH2.

La polarización linfocítica es generada por acción directa de IL-4 sobre el LT naive, induciéndolo a diferenciarse en L TH2. Las interleucinas secretadas por L TH2 son responsables en gran manera del estadio fibrótico del paciente, principalmente por acción de IL-4 e IL-13.

1.2.2.1.1.1 Citoquinas / TH 2

Interleucina-4: La IL-4 estimula quimiotaxis, proliferación y expresión de SMA-a en el fibroblasto, induce expresión del gen TGF- β llevando a síntesis de colágeno y estimula síntesis de Fibronectina (19, 103), la síntesis de colágeno se potencializa por acción de IL-13 (99).

Interleucina-13: IL-13 es una citoquina producida por LTh2 la cual se halla involucrada en el desarrollo fibrotico severo en modelos animales. El gen de IL-13, se halla localizado en el

cromosoma 5 en la posición q31-q33. La IL-13 interactúa con un sistema de receptores: Receptor antagonista IL-4 (IL-4RA) y dos Receptores antagonistas de IL13 (IL-13RA1 and IL-13RA2) cuyos genes se sitúan en el cromosoma X. Polimorfismos asociados a IL-13 (SNPs rs1800925 y rs2243204) y IL-13RA2 (rs638376 y rs5946040) se encuentran en mayor proporción en pacientes con SSc difusa. (70, 71)

Interleucina-6: IL-6: Es una citoquina proinflamatoria secretada por la mayoría de células leucocitarias y otros tipos celulares (72); en el suero, endotelio y fibroblastos de pacientes con SSc se evidencia aumento en la expresión de IL-6; en el fibroblasto induce síntesis de IL-1, TNF- α (88); PDGF (170); IL-4 (17), IFN (17,125) y MCP-1 (44). En el LB estimula la producción de Anticuerpos.

Interleucina-10 IL-10. Es una citoquina anti-inflamatoria pleiotrópica que regula la producción de matriz extracelular al inhibir la proliferación de fibroblastos decreciendo la producción de colágeno y fibronectina aumentando conjuntamente la producción de colagenasas. Polimorfismo asociados en el promotor de la Interleucina-1 (IL-1) situado en la posición 16p12 (-3575,- 2849) (81).

1.2.2.1.1.2 Citoquinas / TH 1

Interferón - γ (INF- γ): Esta citoquina es sintetizada por CD4+ TH1, CD8+ y NK (24); cuya función representativa es estimular proliferación celular, apoptosis y coordinar las interacciones entre leucocitos y células endoteliales por medio de moléculas de adhesión celular y quimioquinas. Por otra parte inhibe la síntesis de colágeno, proliferación de fibroblastos e induce supresión en expresión de SMA- α . Es un potente supresor del efecto de la IL-4 (27,173,175), por lo tanto su baja síntesis en pacientes con esclerosis permite la libre acción de la IL-4.

Interleucina-1 (IL-1): Esta Interleucina es secretada por un gran número de células por lo tanto el desbalance entre Ths no afecta producción de la mismas, por el contrario se ha observado aumento de IL-1 en pacientes con SSc (83, 181); tiene como función ayudar en el proceso inflamatorio ya que induce la síntesis de otras citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión y posible participación en proliferación de fibroblastos (167). El endotelio es uno de los grandes productores de esta IL por lo tanto el propio endotelio juega un papel clave en el compromiso vascular de los pacientes.

Factor de Necrosis Tumoral (TNF= TNF- α conocida como linfotoxina Alfa y TNF- β). Son potentes mediadores pro-inflamatorios. El TNF- α tiene doble acción: a) Inflamatoria: Activa neutrofilos e induce la síntesis de proteínas de fase aguda, moléculas de adhesión y otras citoquinas. b) Antifibrótica: Inhibe síntesis colágeno tipo I, induce producción MMP-1 y MMP-3, contraregula con aumento en la síntesis de TIMP-1 y TIMP-3. En pacientes con Sscd hay altas concentraciones de TNF- α en suero y en líquido broncoalveolar. Existen polimorfismos del gen en la posición 6p21.3 (-252) y en el gen del Receptor TNF tipo II; ambas alteraciones podrían estar asociados con la enfermedad.(148, 168).

1.2.2.1.1.3 Activación LT

Proteína asociada a linfocitos T citotóxicos- 4 (CTLA4); esta proteína es una molécula coestimuladora involucrada en la activación linfocitaria conocida igualmente como CD152 cuando se halla junto a la glicoproteína CD28; se han encontrado en varias enfermedades autoinmunes polimorfismo excesivo del gen CTLA4 localizado en el cromosoma 2 posición 2q33 lo cual conlleva a fallas ocasionadas en el gen promotor; 3 de estas han sido asociadas con Ssc (1722 T/C, -1661 A/G y -318 C/T) (6,102), a su vez se ha citado polimorfismo en el promotor de la molécula coestimuladora CD86 (1).

Proteína Tirosina Fosfatasa, "*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*") PTPN22. PTPN22: Esta proteína expresada en el linaje linfocitario regula la activación de LT por interacción con las quinasas efectoras, a su vez juega un rol importante en la selección negativa del timo y en la inhibición de clonas autoreactivas en sangre periférica. El polimorfismo SNPs -1858C/T en el alelo del gen PTPN22*620W se halla asociado fuertemente en AR, DDMM tipo I y LES (205); aunque un estudio realizado con SSc en US se halló relación entre pacientes con Anti-topoisomerasa I y polimorfismos en el alelo PTPN22*T (69).

1.2.2.1.2 Linfocito B

Las células B en pacientes con enfermedades auto inmunes presentan anomalías intrínsecas involucradas muy seguramente en la patogénesis de dicha enfermedad (131). El número de células B presentes en el organismo determinan el grado de respuesta frente a lo propio o extraño, por lo cual existen mecanismos que regulan la respuesta de acción del linfocito B; si estas vías de regulación son anormales conllevan a presentar autoinmunidad. El principal regulador en la respuesta del LB es la Molécula CD19; el CD19 actúa como

mayor potencializador en la regulación positiva del linfocito B; estudio realizados con ratones transgénicos se observó que las células B que sobreexpresan CD19 casi al triple de la concentración normal tienden a perder la tolerancia generando así anticuerpos contra el propio organismo (169,185).

Se ha mostrado que los LB naive y de memoria de pacientes con SSc sobreexpresan CD19 a diferencia de los linfocitos B de paciente con LES, Miopoliomiositis y otros desordenes autoinmunes por lo que esta sobreexpresión podría ser específica de Esclerodermia (75, 169,170).

Recientemente se ha detectado polimorfismo en el gen promotor del CD19 es un polimorfismo funcional (499 G/T) (192), esta mutación está asociada con sobreexpresión de la misma en LB y con susceptibilidad a presentar SSc, este hecho es demostrado por microarrays DNA de LB en lesiones de piel en SSc (192,203). A su vez los LB naive predominan sobre LB memoria y plasmocitos por intervención de mecanismos apoptóticos.; entendido de otra forma la sobreexpresión de CD19 en los LB memoria incrementa la actividad celular de manera crónica por lo que el sistema lo elimina conjuntamente la médula ósea saca a periferia LB naive para mantener la homeostasis linfocitaria (170).

El complejo mayor de histocompatibilidad asociado en SSc es el HLA de clase II; se ha encontrado expresión de HLA-DQA1*0501 tanto en hombres como mujeres con SSc, sin embargo; existe mayor correlación cuando se estudia el genotipo de los autoanticuerpos producidos en la enfermedad por el LB; los Anticuerpos Anti-topoisomerasa I están asociados con DRB1*1502 (197), DQB1*0601 (67), DPB1*1301 y DPB1*0901; en cambio los anticuerpos Anti-centromero están asociados con DRB1*0101, DRB1*0104, DRB1*0108, DQB1*0501 y DPB1*0402 (67, 112).

Auto anticuerpos Específicos han sido identificados en el suero de los pacientes con Escleroderma (Tabla 1). Aunque no está demostrado el rol de ellos en la fisiopatología de la enfermedad. En los pacientes con ES se han hallado diversos tipos de Autoanticuerpos como lo son: Anti-centrómtero, anti-Scl70, anti-fibrilarina, anti-RNA polimerasa, anti-PM Scl70. Recientes estudios proponen la existencia de Anticuerpos estimulatorios del Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas "PDGFR", induciendo la expresión del gen del colágeno en fibroblastos primarios humanos.

Tabla 1. Autoanticuerpos Hallados en Escleroderma (208)

Escleroderma Localizada	Esclerosis Limitada	Esclerosis Sistémica	Esclerosis Sistémica Difusa
Anti-Histona 47%	Anti-Centrómero 20-30%		Anti-Scl 70 9-20%
Anti- csDNA 50%	Anti-RNA polimerasa 20%		Anti-RNA polimerasa 20%
Anti-Topoisomerasa II α 76%	Anti-PDGFR		Anti-PDGFR

1.2.2.2 Inmunidad Innata

1.2.2.2.1 NK: Estudios sobre el Número absoluto , proporción y actividad de las células NK así como la activación por parte de linfocinas muestran resultados muy heterogéneos por lo tanto no se ha podido describir el comportamiento estándar en pacientes con Ssc (79, 160).

1.2.2.2.2 Células NKT: Las células NKT son células derivadas de linaje linfocítico, estas células son reguladores de la respuesta inmune, incluida la autoinmunidad debido a la expresión en su membrana de marcadores de superficie celular de NK y Células T; los pacientes con trastornos autoinmunes como Ssc presentan disminuida esta población celular; por lo tanto este defecto contribuye en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. El mecanismo principal de regulación por parte de las células NKT se debe a la habilidad de secretar rápidamente altas cantidades de citoquinas propias de activación de Linfocitos TH1 y TH2 (123).

1.2.2.2.3 Moléculas:

- Proteína Quimioattractante de Monocitos (MCP-1/CCL2) es un mediador importante en la patogénesis de Ssc, perteneciente a la familia CC de las quimioquinas; esta quimioquina es sintetizada por células mononucleares, mastocitos, epitelio, células del músculo liso, queratinocitos y fibroblastos (76); el gen que la codifica se ubica en la posición 17q11-q12. Esta quimioquina está especializada en quimioatracción de monocitos circulantes hacia los tejidos, también atrae LT memoria y NK promoviendo la infiltración leucocitaria; Se cree que su acción es mediada por IL-4 del LT. La

MCP-1 esta involucrada en a diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por via CCR2. Estudios han sugerido asociación del polimorfismo (-2518, A/G) del gen MCP-1 con Ssc (97).

- > Factor inhibitorio de migración de macrófago (MIF): El MIF activa la respuesta inmune inhata sus efectos radican en perpetuar la respuesta celular inflamatoria debida a la inhibición ejercida en la via apoptotica desencadenada por P-53, aumenta la proliferación de fibroblastos e inhibe la apoptosis de ellos. La sobreexpresión de MIF y las diferentes variantes geneticas se encuentran relacionadas ocn enfermedades inflamatorias;el polimorfismo del promotor del alelo 173C del gen MIF esta asociada con la presencia de altas concentraciones de MIF en sangre en pacientes con Ssc (206).

1.2.3 Depósito de proteínas de Matriz Extracelular: El proceso fibrótico es la característica principal en Esclerodermia. La fibrosis es un proceso biológico complejo desencadenado por una respuesta inflamatoria aguda y una constante activación de fibroblastos resultando en proliferación continua de fibroblastos, síntesis aumentada de componentes de Matriz Extracelular, Factores de crecimiento y Citoquinas (208).

La matriz extracelular está compuesta por un extenso número de moléculas relacionadas (colágeno I, III, V, VI, XII, XIII, XIV, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, elastina, fibrilina, etc.).

Algunos de los genes involucrados en el proceso fibrótico cuya codificación termina en proteínas de matriz extracelular están asociados con la enfermedad; entre ellos se citan la Fibrilina-1 (FBN1) Fibronectina (FN1) y Secreción de proteínas acidas ricas en cisteína (SPARC); Factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) junto a citoquinas como la Interleucina-1 α (IL-1 α) (183,213).

- > Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β): El TGF- β 1 es el desencadenante principal del proceso fibrótico de la enfermedad ya que este media un sin numero de mecanismos pro-inflamatorios y pro-fibrótico; es decir actúa como factor atrayente favoreciendo así: Infiltración leucocitaria, producción de citoquinas pro inflamatorias, aumento en la síntesis de colágeno por activación de SMAD3 e induce inhibición tisular de Metalloproteinas (TIMPs) (84) previniendo la degradación de la matriz

extracelular, favorece el aumento de CTGF, IL-4, IL-13 y MCP-1 (59,65,122,126). Aun no se han especificados polimorfismos asociados a SSc.

- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF): Es producido por plaquetas, células endoteliales, macrófagos activados, células del músculo liso y fibroblastos; ayudando a la quimioatracción y activación de macrófagos y fibroblastos jugando un papel central en la fibrosis de pacientes con SSc. El PDGF es el principal inductor de proliferación de fibroblastos dérmicos, pulmonares y sinoviales (66,93). La proliferación inducida por el PDGF sobre el fibroblasto sinergia la acción del TGF- β por inducción del PDGFR llevando a la síntesis de colágeno y otras moléculas de Matriz Extracelular (24,167).

- Fibrinila-1 (FBN-1): Esta glicoproteína fibrilar es elemento constitutivo de las fibras elásticas de la matriz extracelular; haplotipos en la región 15q21 están asociados con SSc (171). Se han estudiado 5 SNPs asociados al gen FBN-1: Región intraducida-50 (SNP-1), alteraciones en el exón 15, exón 27, intrón 17 e intrón 27. Se cree que la FBN-1 juega un rol importante en la regulación de TGF- β y la matriz extracelular por lo cual fallas en esta glicoproteína conllevarían a presentar el evento fibrótico. (Lemanier et al; 2006)

- Fibronectina (FN1): Estudios en el gen de Fibronectina (2q34eq35) RFLPs generados por restricción de las enzimas HaeIII, MspI, HindIII y TaqI muestran disminución homocigota significativa para la HaeIII cutting site (BB) y para la MspI cutting site (DD) en pacientes con fibrosis pulmonar (94 /161 pacientes con SSc) (Ávila JJ ,1999). Igual se observó coasociación con genotipos heterocigotos AB (HaeIII RFLP) y CD (MspI RFLP) en 45% de pacientes con fibrosis pulmonar en comparación con 29% de pacientes sin fibrosis pulmonar.

- Proteína ácida secretada rica en cisteína “Secreted protein acid and rich in cysteine” (SPARC/ Osteonectina): SPARC son glicoproteínas multifuncionales secretadas por la matriz extracelular en momentos de remodelación y/o reparación; una de sus principales funciones es regular las interacciones células-matriz; el gen SPARC inhibe en un 50% la expresión de COL1A2, COL3A1 y CTGF por medio de un pequeño RNA de interferencia (siRNA) (20); este gen se encuentra ubicado en la posición 5q31e32, estudios han confirmado por cultivo de fibroblastos dermales de pacientes con SSc por medio de microarrays la sobreexpresión de dicho gen.

(213,214). Tres de los SNPs asociados con SSc se citan a continuación: Región sin traducción-30 (+998 (C/G),+1551 (C/G), +1922 (T/G)) (Lagan AL, et al ; 2005)

- > Interleucina-1 α (IL-1 α): Es una citoquinas pleiotrópica participe en la respuesta inmune, en la inflamación y la hematopoyesis, esta ayuda a modular la regulación del TGF- β . El gen IL-1 α se halla en el cromosoma 2 posición 2q14). Tres SNP polimorficos (-889C/T, +4845G/T, and +4729T/C) y un haplotipo (CTG) son asociados con la severidad de la enfermedad

Los pacientes con ES tienen incrementado el colágeno tipo 1 y tipo 3, el tipo 1 esta en mayor proporción y es codificado por los genes COL1A1 y COL1A2 los cuales son controlados por el Factor de transcripción SP1. (150). La expresión progresiva del gen del colágeno tipo 1 afecta por una posible acción sinérgica la concentración y expresión del Factor transformante de crecimiento- β "TGF- β " (211); El TGF- β 1 es el desencadenante principal del proceso fibrótico de la enfermedad ya que este media un número de mecanismos pro-inflamatorios y pro-fibróticos; actuando como un factor quimiotáctico favoreciendo infiltración leucocitaria, la producción de citoquinas pro inflamatorias, aumento en la síntesis de colágeno por activación de SMAD3 e induce inhibición tisular de Metalloproteinas TIMPs (90).

1.2.3.1 Fibroblastos

Los fibroblastos SSc participan de manera activa en la respuesta inmune debido a: Producción de citoquinas y quimioquinas; aumento en regulación de moléculas de adhesión y coestimuladoras (27, 209). Los fibroblastos en pacientes con ES muestran variaciones en el mRNA pro-colágeno, resistencia a regulación por parte de Linfocitos TH1, resistencia a apoptosis mediada por Fas, expresión de α -SMA, incremento el número de receptores TGF- β con aumento de sobreactivación fibroblástica continua por medio de citoquinas como la IL-1, TGF- β , Factor de crecimiento derivado de plaquetas, Proteína Quimioattractante Monocítica-1 (90, 155,179).

2. CÉLULAS MADRE

2.1 Generalidades

Las Células Madre o Stem cell; son células progenitoras que pueden diferenciarse hacia múltiples linajes celulares caracterizándose primordialmente por la capacidad que tienen de autorenovarse con un elevado potencial de proliferación. Dependiendo de su capacidad de multidiferenciación han sido subdivididas en 4 grupos (2, 163).

- Células Madre Totipotentes: Da origen a tejidos Embrionarios y Extraembrionarios, es decir; pueden crear a un embrión completo.
- Células Madre Pluripotentes: Da origen a tejidos de las 3 capas Embrionarias “Ectodermo, Mesodermo y Endodermo”
- Células Madre Multipotentes: Da origen a tejidos de solo una Capa Embrionaria
- Células Madre Unipotenciales: Da origen a una sola línea Celular determinada.

Cuando se habla de la capacidad autorenovadora; se refiere a la habilidad y/o capacidad de generar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen. (60)

Adicionalmente existe una clasificación basada en la organización animal superior subdividiéndose en Células Madre Embrionarias y Células Madre Adultas.

2.2 Células Madre Embrionarias

Las células madre embrionarias (embryonic stem cells o ECS), se originan de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocito “7-14 días”, a partir de esta estructura se originarán las tres capas embrionarias que darán origen a todos los tejidos del cuerpo humano: Ectodermo, mesodermo y endodermo (51). Estas células son capaces de generar los diferentes tipos celulares del cuerpo, por ello se llaman células pluripotenciales, pues conservan el potencial de formar tejidos diferenciados lo que posiblemente servirá como una potencial aplicación terapéutica en múltiples enfermedades. A partir de estas células se derivaran otras múltiples divisiones celulares << las células madre órgano-específicas>>; estas células madre multipotenciales son capaces de originar las células de un órgano del embrión y en el individuo adulto (141).

2.3 Células Madre Adultas

Las células Madre adultas “ASC”, son células indiferenciadas que pueden estar presentes en tejidos diferenciados con propiedades de autorrenovación. Desde hace décadas se conoce que estas células son capaces de especializarse en células idénticas a las del tejido de

origen (105). Generalmente se dividen y producen células progenitoras o precursoras que se diferencian en células con características y funciones especializadas idénticas a las de las células de un tejido específico.

Las ASC se pueden encontrar en Médula ósea, sangre y cerebro. Los estudios han sugerido que son muy versátiles y tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares; las principales ASC encontradas en el cuerpo humano son las células stem hematopoyéticas (HSCs), células stem de origen mesenquimatoso (MSCs), células de la sangre y gelatina de Warthon del cordón umbilical humano. In Vitro se ha comprobado que estas células cultivadas y sometidas a distintos ambientes humorales pueden transdiferenciarse ya que estas células tienen la propiedad de Plasticidad, es decir; diferenciarse y dar creación a otros tipos celulares diferentes a los del tejido origen (188).

La principal función del ASC es estar en el organismo para mantener y reparar los tejidos en los cuales se encuentren. Algunos científicos utilizan el término de Células Madre Somáticas en vez de Células Madre Adultas, pero teóricamente son la misma población celular.

Desde hace 40 años aproximadamente se ha venido investigando sobre las ASC, cuando en 1960 unos investigadores descubrieron que en Medula ósea existían 2 tipos de células Madre: Las Células Madre Hematopoyéticas de las cuales se originan todas las células sanguíneas del cuerpo y Las células Estromales de Medula ósea, definidas como una población mixta que puede generar Hueso, cartílago, grasa y tejido conectivo fibroso poco tiempo después se incluyeron aquí las células madre Neuronales.

Dicho anteriormente las ASC pueden ser obtenidas de muchos órganos y tejidos; cada una de las cuales reside en un área específica donde se mantienen sin dividirse hasta que son activadas por enfermedades o daños tisulares; han sido aisladas de cerebro, medula ósea, sangre periférica, vasos sanguíneos, músculo esquelético, tejido graso, piel e hígado.(88)

2.4 Células Madre Hematopoyéticas

Las células madre Hematopoyéticas dan lugar a las células de la sangre y se mueven entre la médula y la sangre Periférica; estas son las células madre mejor caracterizadas en los seres humanos adultos Las células madre hematopoyéticas mantienen la hematopoyesis continua y restablecen la producción de células sanguíneas. Claro está que si este proceso es sobre estimulado, es decir existe una expansión clonal anormal se puede originar un desorden mielóide o linfóide cómo lo son la leucemia mieloproliferativa crónica, policitemia

vera y síndromes mielodisplásicos entre otros. (2).

Habitualmente se ha empleado el marcador de superficie CD34 para la identificación de estas células, pero estudios más profundos han mostrado que su inmunofenotipo es más complejo, ya que puede expresar un espectro de marcadores de acuerdo con su estado de diferenciación. En los últimos años se ha incorporado un marcador de superficie (CD133) que indica un estadio más inmaduro de estas células CD34 y se han encontrado células CD133+, CD34-, CD38-, así como CD34+, CD38- y CD34+., CD38+. 35 Un inmunofenotipo característico se considera CD133+, CD117+ (c-kit), CD34+, CD38-, Lin- (marcadores de linaje celular). Aunque algunos autores señalan que hay casos que pueden expresar CD45. (202)

Se ha sugerido que las células madre hematopoyéticas son capaces de contribuir en buena medida a la angiogénesis y vasculogénesis. Por lo que en la actualidad se acepta la existencia del hemangioblasto como un progenitor común endotelial y hematopoyético, lo que apoya en gran parte la potencialidad endotelial de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea (4, 72). Igualmente se ha señalado que la interrelación entre las células hematopoyéticas y las endoteliales, es un hecho esencial para la angiogénesis, puesto que en esta interviene la liberación de varios factores angiogénicos por las células hematopoyéticas, como angiopoyetinas y factores de crecimiento del endotelio vascular. Tanto en la médula ósea humana como en sangre periférica, la célula progenitora endotelial se ha caracterizado como CD133+ , CD34+ VEGFR2+ , lo que indica su estrecho vínculo con la célula madre hematopoyética. A estos marcadores se suman antígenos distintivos como el CD146 (sialomucina) y el CD144 (VE-Cadherina) con pérdida del antígeno CD133 en el proceso de maduración (4). Igualmente se ha sugerido que las células madre hematopoyéticas son capaces de contribuir en buena medida a la angiogénesis y vasculogénesis. Por lo que en la actualidad se acepta al hemangioblasto como un progenitor común endotelial y hematopoyético, apoyando axial la potencialidad endotelial de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. (4, 72)

2.5 Células Madre Mesenquimales

2.5.1 Generalidades

Las células madre mesenquimales (MSC) o células estromales procedentes de Medula ósea; son progenitores multipotenciales no hematopoyéticas capaces de diferenciarse hacia múltiples tejidos mesenquimales (144). Estudios han demostrado que las MSC se diferencian

en varios tipos celulares del tejido mesodermal dependiendo del microambiente en el que se hallen ya sea In vivo o In Vitro; como Condrocitos, Mioblastos, Adipocitos. (Prockop DJ. 1997).

Las MSC pueden ser aisladas de médula ósea, páncreas, tejido adiposo, dermis, hígado, pulmón y cordón umbilical (Zhao, 2004). Las MSC no expresan marcadores de linaje hematopoyético, estas carecen de CD34, CD45, CD14, Glicoforina A, y marcadores de superficie de células T y B; en cambio se ha demostrado la expresión fenotípica de CD73, CD105, CD90, Stro1. Por lo cual hasta el momento no existe una sola molécula que represente a esta línea celular; haciendo necesario el uso de un panel de marcadores moleculares que permitan la diferenciación por medio de la expresión positiva y/o negativa de estas moléculas y/o marcadores asociados a las MSCs (46, 107).

- **CD73**, o proteína de adhesión vascular de linfocitos 2: Es una 5'- nucleotidasa se encarga de hidrolizar AMP a adenosina. Se ha encontrado CD73 expresado en las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD3⁺, CD4⁺ CD8⁺ y en células dendríticas foliculares, células epiteliales y endotelio. Esta enzima se ha relacionado con la regulación de la disponibilidad de adenosina (188).
- **CD90** (Thy -1): No se le conoce función bioquímica, sin embargo, se cree que participa en inhibición de la proliferación y diferenciación de las células Stem hematopoyéticas. En líneas celulares de tejido conectivo, estromal y fibroblastos presenta un alto grado de expresión.(134)
- **CD105** (Endoglina): Actúa como modulador de las interacciones del TGF- β con sus receptores señalizantes, por lo tanto regula la respuesta celular al TGF- β . Se expresa en células del estroma de ciertos tejidos como médula ósea, células endoteliales y en vasos sanguíneos. (91)
- **Stro-1**: Es uno de los marcadores más importantes; las células que expresan Stro-1 se diferencian en tipos celulares de linaje mesenquimal y se comportan como unidades formadoras de colonia fibroblásticas (UFC-F) capaces de transformarse en fibroblastos de soporte para las células Stem hematopoyéticas, células de músculo liso, adipocitos, osteoblastos, y condrocitos. (107,172)

El uso de MSC como terapia promisorio se debe a sus propiedades en regeneración y reparación de tejidos; al igual por evidenciar capacidad inmunoprivilegiada e

inmunomoduladora.

2.5.2 Acción Inhibitoria

Las MSCs inducen detención de la división celular de las células T en una reacción mixta de linfocitos (RML) de manera irreversible (108); a su vez se ha demostrado como las MSC pueden inhibir la proliferación de linfocitos inducido por aloantígenos y por mitógenos no-específicos " Fitohemaglutinina y Concaivalina A" (120,191). En co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica, las MSC incrementan la proporción de subpoblaciones de linfocitos T con fenotipo de células reguladores como CD4+/CD25^{alto}, CD4+/CTLA-4+, CD4+/CD25+/CTLA-4+ (127).

Las células MSCs también pueden inhibir la proliferación y diferenciación de las células B, maduración y proliferación de las células dendríticas y suprimir la proliferación de células natural killer y citoquinas, al igual que a las IL-2 y IL-15 (115).

2.5.3 Mecanismo Inmunomodulador

La expresión de moléculas CMH sobre la superficie celular de todas las células del cuerpo contribuyen a ayudarle al sistema inmune a distinguir entre lo propio y lo extraño. Las MSCs tienen marcadores de superficie del epitelio tímico y expresa conjuntamente moléculas de adhesión (VCAM-1, molécula de adhesión intracelular-2) y Molécula de función linfocitaria asociada a antígeno-3, estos son elementos claves para su interacción con los LT; (40, 44-45, 130, 152).

Las MSCs humanas (hMSCs) adultas expresan niveles intermedios de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MCH) y HLA clase I y no expresan MHC-HLA de clase II ni moléculas coestimuladoras (CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40). Por medio de western blot se demostró que las MSCs lisadas muestran depósitos intracelulares de aloantígenos clase II e Interferón- γ (102, 121, 191). Por lo tanto en ausencia de supresión inmune o mecanismos tolerogénicos, las células alogénicas son rechazadas por el sistema inmune del receptor debido a la expresión células de MCH y antígenos extraños. Estos complejos MCH-Ag estimulan directamente al LT en presencia de moléculas coestimuladoras. Lo anteriormente citado recalca la hipoinmunogenicidad de la MSC.

Los mecanismos inmunomoduladores empleados por las células stem mesenquimales han sido estudiados y probados en modelos In Vitro e In vivo demostrando inhibición de células del sistema inmune por lo tanto suprime la respuesta inmunitaria. Los mecanismos exactos por lo cual logran esto aun se halla desconocido ya que cuenta con un amplio repertorio de elementos; entre ellos se encuentran el contacto celular y los factores solubles como la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), TGF- β 1, prostaglandina E2, factor de crecimiento de hepatocitos y síntesis de algunas citoquinas. (46, 107, 136, 146,155).

2.5.3.1 Efectos MSC sobre LT:

Las MSCs induce inhibición de LTs (CD4-CD8 / Virgen-Memoria) de manera eficiente sin llevarlos a apoptosis; además estudios in Vitro han demostrado que las MSC no son inmunógenas para células mononucleares (LT aloreactivos) de sangre periférica tras realizarse un cultivo celular mixto primario y secundario con LT y MSC aun en presencia de mitógenos. El mecanismo inhibitorio por el cual la MSC lleva a cabo este proceso esta mediada por contacto directo y secreción de moléculas solubles. Esta teoría tiene por base estudios realizados en cocultivos entre PBL y MSC separados por una membrana semipermeable evidenciando igualmente supresión en la estimulación del LT. (12, 25, 47, 102, 109, 118, 120-121, 129, 153, 157-158, 191).

La expresión de marcadores asociados a activación linfocitaria CD25 (Receptor estimulado-IL2), CD38 y CD69 decrece en presencia de MSCs (26, 102, 152, 153, 157); al tiempo que las MSC inhiben la activación linfocitaria que conlleva a proliferación, la producción INF- γ o aumento de marcadores asociados a activación. Se aclara que la MSC no solamente induce fallas en la activación de LT CD4 sino que además escapan a la lisis del LT citotóxico CD8 y NK (157). La Inhibición del CD8 se da ha consecuencia de un péptido específico en la HCM de clase I aunque otros análisis indican que las MSC inducen un programa de abortaje de activación en las CD8. ("HLA"l. Rasmusson, M. Uhlin, K.Le Blanc and F.V. Levitsley, unpublished observation). Como se cito anteriormente la hMSC suprimen la formación de CD4/CD8 por medio de factores solubles, estos factores en su mayoría no son constitutivos de MSC ya que en cultivos de células en suspensión no hay supresión en la proliferación LT. (47, 102, 118, 129, 152,157, 191).

Las MSC producen TGF- β 1 en respuesta a IL-2 e IL-4; esta molécula es un potente inhibidor de la proliferación de LT; además inhibe a los timocitos triplemente negativos (CD

3-, CD 4-, CD 8-) (8, 47, 120, 165). Anticuerpos contra el factor de crecimiento de hepatocito y TGF- β 1 restauran parcialmente la proliferación de células T purificadas pero no de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). (120) Otros factores que jugarían rol en la inmunosupresión incluyen citoquinas como INF- γ , IL-10, TNF- α e IL-12. Liu junto con otros grupos investigativos demostraron que se disminuía la actividad supresora MSC si se adicionaba anticuerpos específicos para FasL, INF- γ y TGF- β 1 en cultivos mixtos de linfocitos; en los estudios realizados con anticuerpos neutralizantes contra FasL y TGF- β 1 en cultivos mixtos de linfocitos estimulados con Conca-A se observo que la inhibición en la supresión de la MSC se comportaba de manera dosis dependiente; Ac anti-IL10 no muestran efecto. (108, 124)

La MSC hace inhibición de la proliferación del LT por la producción de IDO; esta es inducida por el INF- γ y de forma dosis dependiente, la función de la IDO radica en catalizar la conversión de Triptófano (tryp) a quinurenina; varios estudios postularon que la inhibición de la respuesta de la célula T por la MSC era debido a depleción de Tryp. (136, 139) El L-triptófano es uno de los diez aminoácidos esenciales; es un aminoácido aromático, apolar y presenta un anillo indólico en su cadena lateral con capacidad de establecer enlaces débiles con estructuras semejantes, por lo cual se clasifica como un aminoácido hidrofóbico (33). El Tryp es necesario para la biosíntesis de proteínas estructurales y funcionales, en el organismo es el principal precursor del neurotransmisor serotonina, la vitamina niacina y de la hormona melatonina que es secretada en la glándula pineal.

La enzima IDO ha sido encontrada en los tejidos extrahepáticos como intestino, pulmón, placenta y cerebro; como en algunas células del sistema inmune (macrófagos y células dendríticas) (131). La IDO posee un Km muy bajo (20 mM), por lo que la afinidad de la enzima por el triptófano es considerable (31-32, 140). La vía metabólica del Tryp hasta quinurenina se resume de la siguiente manera: Inicia con una oxidación del triptófano y se convierte en N-formilquinurenina esta es rápidamente hidrolizada a quinurenina, la quinurenina conduce a varias vías de degradación cuyos productos finales son el ácido quinureico, el 3-OH-kinurenina, el 3-OH-ácido antranílico, el ácido picolínico y los metabolitos de niacina. Los productos de la degradación del triptófano previamente mencionados participan en la activación y en la supresión del sistema inmune. Los más relevantes son la 3-OH-kinurenina y el 3-OH-ácido antranílico, y en menor grado la quinurenina y ácido picolínico. El ácido picolínico actúa como un coestimulador del Interferón gama (INF- γ) en la activación de los macrófagos (199). Se demostró que los metabolitos del tryp inducen la apoptosis selectiva de timocitos murinos y linfocitos Th1, pero no células Th2 "in-Vitro" (186).

El INF- γ es un potente inmunomodulador con efectos antiproliferativos y antineoplásicos, capaz de inducir la expresión de laIDO en diferentes célula como macrófagos, células dendríticas, líneas de células tumorales, fibroblastos de piel y tejido conectivo sinovial (34); últimamente se ha identificado su expresión en MSCs. Los efectos antiproliferativos del INF- γ se han observado en líneas celulares de tumores debido a la disminución de triptófano en los medios de cultivo (31). Recientemente se demostró que la expresión de laIDO en las células dendríticas humanas inducida por el INF- γ , lipopolisacáridos (LPS) o a través del ligando CD40, es capaz de metabolizar grandes cantidades de triptófano e inhibir la proliferación de linfocitos T; en cocultivos de células dendríticas y LT, el INF- γ fue el más potente inductor en la síntesis de laIDO (84). En otro estudio se demostró que el factor de necrosis tumoral alfa participa en la inducción de laIDO en respuesta al estímulo con LPS (61). Sin embargo estudios han sugerido que el INF- γ estimula la producción de moléculas HCM clase I-Clase II en la superficie células MSC, induciendo las a presentar antígenos al LT CD4 (38).

La actividad de laIDO fue detectada de forma significativa en LT tratados con mitomicina C PBMC en presencia de MSC. La adición de Tryp restaura la proliferación del LT sugiriendo que la actividad de laIDO actúa como mecanismo supresor de MSC. Sin embargo la depleción de Tryp no es responsable del efecto inmunosupresor en el MLC son los productos de degradación del mismo (136, 191).

La prostaglandina E₂ (PGE₂) es sintetizada por la enzima Ciclo Oxigenasa (COX) esta induce regulación en el LT; la MSC expresan constitutivamente COX-1 y COX-2. En cocultivos purificados de MSC y LT; tanto la COX-2 como la PGE₂ se hallan aumentadas; igualmente la síntesis de PGE₂ inhibe la proliferación de LT estimulados con PHA en cocultivo con MSC. Tse et, al. Estudiaron cocultivos de MSC con LT aloreactivos contra LT estimulados con mitógenos; encontraron que la producción de IL-10, TGF β 1, PGE₂ y productos metabólicos de Tryp eran los responsables de la supresión en MLC. Una de las principales funciones ejercida por PGE₂ es regular la acción de la IL-2 suprimiendo la producción de la misma; afectando de manera directa la proliferación del LT. (6, 9, 13, 191)

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) tiene la habilidad de modular la función celular dendrítica y previenen la enfermedad injerto vs. huésped (GVHD) (53). Conjuntamente Di Nicola encontró que el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) son mediadores de la supresión de la proliferación de

células T en una Reacción Mixta de Linfocitos (RML) cocultivado MSCs, al adicionar anticuerpos neutralizantes contra TGF- β y HGF se restaura la respuesta proliferativa de las células T (117).

2.5.3.2. Efectos MSC sobre LB

Las MSC han mostrado la capacidad de inhibir la proliferación linfocítica inducida por mitógenos adscritos a la célula B o LB (Mitógeno pokeweed y Proteína A staphylococcus aureus); la estimulación linfocítica del mitógeno pokeweed es dependiente de LT y la estimulación de proteína A es dependiente de LT y LB por lo que la proliferación no puede ser diferenciada. Las MSCs inhiben la estimulación de la célula B por factores solubles anti-CD40 y anti-IL4. La proliferación LB es arrestada en fase G0/G1 del ciclo celular sin generar apoptosis (22, 42, 68, 120, 124, 161).

Cuando los LB purificados son activados la producción y niveles de Igs (IgM; IgG; IgA) se reducen por la MSC solo si las células se agregan en un radio 1:1, no en un radio menor. La MSC no inhibe la producción TNF- α , INF- γ , IL-4 e IL10 por el LB. Las MSCs aumenta la expresión de receptores de quimioquinas CXCR4, CXCR5 y CCR7B como la quimiotaxis a CXCL12, ligando CXCR4 y CXCL13, CXCR5 lo cual sugiere que altos números de MSC afectan las propiedades quimiotácticas de LB (41,156). Sin embargo; con todos estos avances los resultados aun no soportan el uso de la MSC en enfermedades autoinmunes, donde las células B juegan un rol de importancia.

Corcione et.al. Reportaron recientemente que MSCs cocultivadas con LB purificados CD19+ en presencia de un cóctel de estimuladores se evidencio significativa inhibición en la proliferación del LB. De manera intrigante la inhibición máxima se consigue en un radio 1:1 y se va perdiendo progresivamente en 1:5 y 1:10, es marcado contraste en comparación a la inhibición en LT por la MSC. Las MSC cocultivadas con LB en placas con membranas. Estudios igualmente muestran que las células B cocultivadas con MSC aumentan la expresión de CXCR4, CXCR5 y receptor de quimioquina CXCR7 exhibiendo un defecto en la quimiotaxis (41, 51).

2.5.3.3. Efectos MSC sobre NK

Las células Natural Killer (NK) son células de actividad citolítica espontánea a células blanco que no expresan moléculas HLA clase I, esto es mediado por la regulación que ejerce la NK en el balance de señales transmitidas por receptores activadores e inhibidores

que interactúan con moléculas HLA en células blanco. La MSC reduce la secreción de IL-2 e IL-15, aumentando y redireccionando la proliferación de NK llevando a aumentar la síntesis de INF- γ ; la MSC no puede inhibir la lisis mediada por la NK en células K562. Un radio 1:1 de MSC y CMN puede inhibir a ambos pero no en un radio 1:10 ya que no se evidencia inhibición de las funciones citotóxicas de LTC y NK. Por lo tanto estudios sugieren que las MSC en altas concentraciones son capaces de bajar la expansión de LTC y NK. Pero no es viable ya que tan altos niveles de MSC no pueden ser usadas In vivo (6, 127, 157).

Se cree que el mecanismo inhibitorio de la MSC sobre la NK requiere contacto célula-célula posiblemente por mecanismos más complejos a los vistos hasta el momento. Se ha demostrado parcialmente que la secreción de PGE2 por las MSCs afecta la proliferación de las células NK, la expresión de CD56 y su citotoxicidad, pero no interfiere con la producción de citoquinas o expresión de receptores de activación. La inhibición de TGF- β parcialmente restaura la proliferación de células NK, indican que este factor suprime la actividad de las células NK por medio de diferentes mecanismos (178).

2.5.3.4. Efecto de MSC sobre la Célula presentadora de Antígeno (CPA)

Las MSC reducen indirectamente la activación LT al reducir la producción de células dendríticas de monocitos, la MSC inhibe la diferenciación y función de la CD derivada de monocito al alterar su sistema de membrana (92, 127); inhibiendo conjuntamente la regulación positiva de CD1A, CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) y HLA-DR durante el proceso de maduración de DC; por lo tanto las DCs inmaduras no pueden activar de manera efectiva al LT; la inhibición de DCs es restaurada al removérseles la MSC (6, 26, 92, 211). Las Células Dendríticas (DCs) juegan un papel en la inducción de inmunidad y tolerancia, proceso dependiente del estado de activación, maduración, citoquinas circulantes y sitio de inflamación (166).

Es importante el aislamiento de DC para el cocultivo con MSC, en este se evidencia una potencial reducción en la actividad de las células CD4 en MLC (92). A su vez la MSC reduce la secreción de citoquinas proinflamatorias en la DC (INF- γ , IL-12 y TNF- α) con incremento en la producción de la citoquina supresiva IL-10. El TNF- α inhibe la maduración, migración y habilidad de la DC para estimularse con células T aloreactivas por lo que esta puede ser una vía adicional de inmunosupresión empleado por la MSC. En presencia de IL-10 las células dendríticas plasmocitoides secretan IL-10 y estas se caracterizan por la expresión de

antígeno BDCA4 incrementada luego de una estimulación con LPS (6, 26, 92, 158).

La producción de IL-6 y Factor Estimulador de Colonias Monocíticas (M-CSF) por las MSCs podrían contribuir al efecto inhibitorio de la diferenciación de DCs, debido a la discrepancia encontrada en diversos estudios. Se ha observado que la PGE2 puede ser un factor intrigante en la interacción de MSCs-DCs; al inhibirse la síntesis de PGE2 es restaurada la secreción de TNF- β y INF- γ por DCs en cultivo en presencia de MSCs (6). El incremento en la producción de IL-10 por DCs en cocultivo con MSCs puede contribuir al efecto supresivo de MSCs. Anticuerpos neutralizantes IL-10 de hecho restauran la proliferación de células T (26) aunque no completamente.

Los monocitos CD14+ activan MSC a secretar factores solubles como IL-1b que inhibe células T aloreactivas. En términos generales el efecto de MSC sobre CPA juega un rol importante en la inhibición de la activación célula T (73).

3. APLICACIÓN

El HSCT es un procedimiento de terapia celular que tiene por objeto sustituir un sistema hematopoyético previamente alterado por otro sano capaz de reconstituir una linfhemopoyésis normal a largo plazo; las células stem hematopoyéticas (HSC) pueden derivar de médula ósea, sangre periférica y/o sangre de cordón umbilical del propio paciente, conocido como trasplante autólogo o de un donante familiar/no emparentado histocompatible denominado trasplante alogénico. Habitualmente las HSC se obtienen de manera factible post movilización celular con Factor de crecimiento estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF); por seguridad es preferible emplear las células propias del paciente debido a la existencia persistente de hacer Enfermedad injerto contra huésped (GVHD) en trasplantes alogénicos (64).

Se ha observado que en modelos animales y estudios de pacientes la transferencia de Células Stem Hematopoyéticas (HSC) puede revertir de manera considerable el proceso de autoinmunidad; lo cual las harían papel determinante en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Los mecanismos por los cuales las células stem hematopoyéticas (HSC) logran esta "cura" aun son pobremente entendidos (57).

3. 1 Antecedentes

Desde hace ya algún tiempo médicos hematólogos y reumatólogos se dieron cuenta que los pacientes a quienes se les realizaban trasplante de médula ósea inicialmente y posterior trasplante de células hematopoyéticas, por causa como cánceres, u otras enfermedades pero que concomitantemente padecían de enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico o artritis reumatoide, no solo mejoraban de su enfermedad de base sino también de su la sintomatología de su proceso autoinmune.

Esta terapia tubo sus inicios con Jacobs y Roubenoff en 1986, ellos evidenciaron como una paciente con artritis reumatoide tratada con sales de oro desarrolló anemia aplásica, luego de practicársele el trasplante de médula ósea las dos condiciones mejoraron.

Dirk Van Bekkum en 1991 experimentaron con modelos animales de Artritis reumatoide y trasplante de médula ósea asociada a radioterapia, observando que la enfermedad remitía por cierto periodo de tiempo. En 1994-1995 Salzman- Fastenrath observo en pacientes con linfoma, Lupus eritematoso Sistémico y miastenia gravis que al ser sometidos al tratamiento hematológico mejoraron de su patología autoinmune. (180)

Pero fue hasta 1996, cuando Marmont y Tyndall realizaron las primeras intervenciones terapéuticas con trasplante de células hematopoyéticas, en pacientes que padecían de artritis reumatoide y esclerodermia sistémica (198).

Con el transcurso de los años y basados en la experiencia de grupos pilotos, prospectivos y multicéntricos se ha creado a nivel mundial principalmente en Europa y USA grupos especializados en la investigar el valor terapéutico del Trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas (aHSCT) en enfermedades autoinmunes como Escleroderma (SSc).

En la actualidad el tratamiento convencional en escleroderma esta basado en el uso de inmunomoduladores como el metrotexate y ciclosporina, o en el manejo de las manifestaciones clínicas con el uso de inhibidores de los canales de calcio para el fenómeno de Raynaud, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina para evitar las crisis renales, antifibróticos como la D-Penicilamina o inhibidores de la bomba protones para el reflujo gastroesofágico.

La agresiva inmunosupresión con potentes agentes citotóxicos como la Ciclofosfamida, se reserva para tratar enfermedad progresiva severa con fibrosis de órganos blanco y

refractareidad a otros tratamientos. Pero en los casos donde existe refractareidad total a todos los esquemas convencionales se ha aplicado el Trasplante de Células Stem Hematopoyéticas (HSCT).

3.2 Aplicación Trasplante autólogo en Esclerosis Sistémica

El trasplante autólogo de células stem de sangre periférica ha sido empleado mundialmente con una baja tasa de mortalidad < 5%. En los últimos estudio se han empleado intensas inmunosupresiones posteriores al trasplante autólogo de células stem hematopoyéticas (HSCT) como tratamiento potencial en pacientes Esclerosis sistémica severa. Desde 1996 hasta marzo de 2007, se han reportado aproximadamente 1000 trasplantes de células stem de sangre periférica en enfermedades autoinmunes, 140 pacientes de los cuales tenían SSc y estaban registrados en el EBMT (Grupo Europeo de trasplantes sangre y medula) y en el EULAR (Liga Europea contra el Reumatismo).

Los primeros resultados arrojados en las fases I y II de los ensayos clínicos mostraron que el HSCT es de uso factible en pacientes seleccionados cuidadosamente con SSc difusa. En el 2004 se reporto el estudio de seguimiento por EBMT y EULAR considerando los diferentes centros y esquemas de tratamiento; este mostró una respuesta positiva a 3 años en 2/3 de 57 pacientes con una morbilidad relacionada con el tratamiento de 8,7 % (125).

3.3 GRUPOS ESPECIALIZADOS EN ESCLEROSIS SISTEMICA

3.3.1 ASTIS

ASTIS “ Autologous Stem Cell Transplantation for Severe Systemic Sclerosis” es un estudio multicéntrico, prospectivo, aleatorizado y controlado en fase III, para comparar la eficacia y la seguridad del trasplante autólogo de células stem hematopoyéticas con ciclofosfamida intravenosa mensual en pacientes con esclerosis sistémica difusa. Este grupo fue auspiciado por la organización europea de trasplante de medula ósea (EBMT) y la Liga europea contra el reumatismo (EULAR) y aprobado por el comité ético de Australia, Austria, Francia, Alemania, Grecia, Italia suiza y Estados Bajos.

El propósito de esta investigación es comparar la eficiencia y calidad de vida ofrecida de los 2 diferentes tratamientos empleados en Esclerosis Sistémica Difusa. Ambos tratamientos administran Ciclofosfamida (CY) mensualmente durante 12 meses/1 año. La terapia continua con CY no puede ser curativo pero si ayuda en el tratamiento de ES “Esclerosis Sistémica”

(18).

Algunos pacientes no responden a terapia continua o tienen una respuesta muy pobre por lo cual nuevos tratamientos han estado en estudio. Uno de esos estudios es llamado: Altas dosis de Inmunoablación y Trasplante autólogo de células stem. Esta Inmunoablación se logra con altas dosis de CY y otro medicamento como la Gammaglobulina Anti-timocito (ATG). Esta se administrara posterior a la infusión especial de células stem donadas por el paciente. Estas células Stem proliferaran y crearan un nuevo sistema inmune que disminuirá la progresión de la Esclerosis.

Los pacientes con Esclerosis Sistémica Difusa entraron en una evaluación pre-estudio, la cual incluyo un detallado estudio físico, pruebas de laboratorio, biopsias de piel, rayos X, CT Scans, Electrocardiogramas, consulta dental y aspirado de medula ósea con firma previa del consentimiento informado; para determinar si los pacientes cumplían con los requerimientos para ingresar en el estudio (18).

3.3.1.1 Criterios de elección

3.3.1.1.1 Inclusión:

1. Edad entre 18 y 65 años
2. Diagnóstico de esclerodermia sistémica por los criterio ACR
3. Esclerodermia difusa: Duración de la enfermedad < 4 años desde el primer signo cutáneo con puntaje >15 de índice de Rodnan modificado, con compromiso orgánico definido así:

a) Compromiso respiratorio:

- DLCO o FVC <80%
- Evidencia fibrosis pulmonar intersticial por RX o TAC, lavado broncoalveolar

b) Compromiso renal:

- Anormalidades persistentes en el uroanálisis (Proteinuria, hematuria)
- Anemia hemolítica microangiopática
- Insuficiencia renal de novo
- Excluir otras causas

- c) Compromiso cardiaco:
 - Falla cardiaca congestiva reversible, fibrilación auricular o flutter, bloqueo AV de 3 grado , alteraciones de ritmo cardiaco, derrame pericardio
- 4. Esclerodermia difusa <2 años de iniciados las manifestaciones cutáneas
 - >20 índice de Rodnan
 - Compromiso de tronco
 - VSG: 25 o Hb 11
- 5. Consentimiento informado

3.3.1.1.2 Criterios de Exclusión

1. Embarazo o inadecuada método de planificación
2. Enfermedades concomitantes
3. Enfermedad muy severa dada por:
 - a) Compromiso pulmonar:
 - Respiratorio: PAP> 50mmHg (cateterización de corazón derecho)
 - DLCO < 40%
 - Predictores de falla respiratoria
 - b) Compromiso renal:
 - Depuración de creatinina <40 ml/min
 - c) Compromiso cardiaco:
 - Falla cardiaca congestiva refractaria
 - FEV <45% medido con radio nucleótido
 - FA crónica que necesite anticoagulación
 - Compromiso hemodinámico
 - d) Falla hepática:
 - Aumento de 3 veces las transaminasas o la bilirrubina
4. Desordenes psiquiátricos incluyendo abuso de alcohol
5. Neoplasia o mielodisplasia
6. Insuficiencia de médula ósea:
 - Neutropenia <4000

- Trombocitopenia < 50.000
- LT CD4 < 200
- Anemia < 8 g/dl

7. Hipertensión arterial no controlada

8. Infección aguda o crónica

9. Tratamientos previos con agentes alquilantes, irradiación corporal total, ciclofosfamida (>5g IV acumulada o > 3 meses 2mg/Kg)

10. Exposición a bleomicina, tictoroetileno o sílica, síndrome de mialgia eosinofílica, fascitis eosinofílica.

3.3.1.2 Ensayo clínico

Todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se registraron y aleatorizaron a uno de los grupos de tratamiento. El número total de pacientes que entraron al estudio inicialmente fue 42; de los cuales 19 entraron al protocolo de trasplante “Grupo A” y los 23 restantes se les hizo seguimiento con el tratamiento convencional “Grupo B”. Pero en la actualidad se han incorporado 91 hasta mayo de 2007, 43 se llevaron a trasplante de células madre y 48 se trataron con pulsos de ciclofosfamida.

Grupo A: Altas dosis de Inmunoablación y Trasplante autólogo de células stem (Tratamiento a investigar); el tratamiento A consiste en 4 pasos: Movilización, Leucoféresis, Acondicionamiento e Infusión autóloga de células stem: los pacientes necesitaron cateterización de la vena central para iniciar el tratamiento y requerirán hospitalización para realizar el Acondicionamiento y la infusión autóloga de células stem.

- Movilización se refiere al incremento en el número de células stem en sangre periférica; la movilización de células stem se hizo administrando 2 dosis intravenosas de Ciclofosfamida 2g/m² (1 diaria por 2 días). Los pacientes recibirán igualmente Mesna e hiperhidratación para proteger la vejiga. A los 5 días de la movilización los pacientes recibirán inyecciones subcutáneas de Filgrastím (G-CSF) 10 µg/kg/día por 5 días. El Filgrastím es una medicina proporcionada para aumentar el número de células stem en sangre. El conteo sanguíneo debe monitorearse diariamente (18).
- Leucoféresis es un procedimiento por el cual las células stem son separadas del resto de componentes sanguíneos. Este procedimiento dura en promedio 2-3

horas/día por 2-5 días. Las células stem se procesan, congelan y se espera hasta el momento del trasplante.

- El acondicionamiento se refiere a la administración de ciclofosfamida y Globulina Anti-timocito (ATG). La CY fue administrada por vía intravenosa 50 mg/Kg/día durante 4 días; ATG vía intravenosa 2.5 mg/kg/día durante 3 días. Igualmente recibirán Metilprednisona 1mg/Kg para reducir los efectos colaterales de ATG
- Infusión autóloga de células stem se realizara pasadas 48 horas a la última dosis de CY. Las células stem previamente colectadas y congeladas se reconstituirán y se administraran de manera similar a una transfusión sanguínea. Trascurrido el procedimiento los pacientes permanecerán hospitalizados en el hospital para ser monitoreados y tratar las posibles complicaciones. Terminado el tratamiento se le hará seguimiento a los pacientes frecuentemente hasta que ellos se estabilicen y retornen con su oncólogo de cabecera.

Grupo B: Terapia Continua (Tratamiento Estándar), los pacientes recibirán por 12 meses infusiones simples de ciclofosfamida 750 mg/m². Igualmente los pacientes recibieron hiperhidratación y Mesna para proteger la vejiga. Estos deberán ser administrados fuera del hospital o estadios cortos en la clínica

3.3.1.3 Resultados

Los 42 pacientes con Esclerosis Sistémica que habían sido aleatorizados en 16 centros europeos en el 2005: 19 grupo trasplante y 23 grupo control. No presento TRM; Mortalidad relacionada a tratamiento ni se ha observado toxicidad inespecífica en los pacientes con una media de seguimiento a 25 meses (rango 3-46). Se hizo un análisis de seguridad intermedio seguido del enrolamiento de 20 pacientes. LA organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica en grados III, IV los acontecimientos adversos observados en 2/11 del grupo control y 5/9 pacientes trasplantados, todos fueron reversibles a excepción de la insuficiencia renal en uno de los pacientes trasplantados.

El primer informe fue publicado en 2004, donde reportaron (42,193):

1. Mejoría del 69% en el Score de Rodnan disminuyendo un 25% de su línea de base.
2. La mortalidad después de modificado los criterios de inclusión fue de 12.3% en 1 años

posterior a trasplante de células Hematopoyéticas.

3. En cuanto el compromiso visceral no se observó cambios en parámetros de medición pero también observaron que el progreso de fibrosis se detuvo.

3.3.2 SCOT

SCOT; “Scleroderma: Cyclophosphamide OR Transplantation” Es un estudio de investigación giratorio clínico que tiene por objetivo comparar el trasplante autólogo de célula stem contra Altas dosis de Ciclofosfamida en pacientes con las formas severas de esclerosis sistémica.

El estudio SCOT es importante debido al aporte que genera la implementación mayor número de ensayos clínicos para el tratamiento de los pacientes con Escleroderma. Habitualmente no se ha probado que alguno de los tratamientos impidan la progresión de la enfermedad o invierta el daño de los órganos internos. Claro está que la escleroderma afecta a individuos de manera diferente por lo tal los médicos deben adaptar la terapia para manejar síntomas órgano-específicos. Los ejemplos de tratamientos órgano-específicos incluyen medicamentos inhibidores de ACE, bloqueadores de canales de calcio e inhibidores de bombas protónicas. Los inhibidores de ACE son muy eficaces Escleroderma con compromiso renal; la inhibición de los canales de calcio son útiles en la prevención de los ataques de Raynaud, y los inhibidores de bomba protónica mejoran los síntomas de reflujo ácido. Lamentablemente, estas medicaciones no ayudan cuando ahí Escleroderma con afección pulmonar, muscular o articular (174).

El tratamiento órgano-específico es de suma importancia debido a que algunos expertos creen que da un acercamiento más amplio y posiblemente más eficaz en el tratamiento del sistema inmune en su totalidad. El trasplante de células stem y altas dosis de CY permite acceder al sistema inmunológico en su totalidad. Se espera que los resultados de este estudio provean la información suficiente para definir el mejor tratamiento para los individuos que sufren Escleroderma severa.

El objetivo primario es evaluar las diferentes tasas de mortalidad relacionada a tratamiento TRM y el daño visceral significativo entre los 2 grupos en un periodo de 44 meses.

3.3.2.1 Criterios de Elección: Igual a los de ASTIS

3.3.2.1.1 Criterios de inclusión

1. Edad entre 18 y 65 años
2. Diagnóstico de Esclerosis Sistémica de acuerdo a criterios de ARC
3. Esclerodermia difusa con la duración de la enfermedad ≤ 4 años desde el desarrollo del primer engrosamiento demostrable de la piel, que posea una puntuación de Rankin $> / = 15$ en el órgano con mayor compromiso, tal como se define a continuación:

- a. DLCO y/o (F) VC $\leq 70\%$ con evidencia de enfermedad pulmonar intersticial
- b. Afectación Renal como; Hipertensión arterial, alteraciones en el análisis de orina o Insuficiencia renal, Anemia hemolítica Microangiopática.
- c. Afectación Cardíaca como; Insuficiencia cardíaca congestiva reversible, Arritmias Auriculares o Ventriculares (Episodios recurrentes de fibrilación auricular o aleteo).
- d. Consentimiento Informado

3.3.2.1.2 Exclusión

1. Embarazo o falta de voluntad para usar anticonceptivos durante el estudio
2. Concomitantes graves de enfermedad: Respiratoria, Renal, Cardíaca, Falla hepática, Trastornos psiquiátricos, Tumores u otras neoplasias, Hipertensión descontrolada.
3. Infecciones crónicas o agudas descontroladas; HIV, HTLV-1,2 además del screening de Infecciosas (HBsAg, HVC; ect)
4. Pacientes con infecciones Bacterianas
5. Tratamiento previo con TLI, TBI incluidos agentes alquilantes o ciclofosfamida
6. Significativa explosión a Bleomicina, aceite de colza, cloruro de vinilo, tictloroetileno o sílice (Síndrome de mialgia eosinofílica; fascitis eosinofílica)

3.3.2.2 Estudio clínico

En total se incluyeron a 226 pacientes en Norteamérica entre 18 y 65 años durante un período de 3 años, al azar se asignaron en proporción 1:1 de la siguiente manera.

Grupo I: Tratamiento continuo de pulso con Ciclofosfamida mensualmente durante 12 meses/1 año. La exposición razonable para la CY mensual está basada sobre una cantidad significativa de datos previos. La dosis de 750 mg/m² para 12 infusiones mensuales es aproximadamente el doble de dosis de CY dada a los pacientes con trasplante de células

stem, se escogió de tal forma par hacer refuerzo y equilibrio entre los dos regímenes. Además, el uso de Cy en el programa SCOT es similar al programa empleado en el estudio de ASTIS lo cual permitirá la comparación eventual de los 2 estudios (174).

Grupo II: La Terapia con altas Dosis de Inmunosupresores (HDIT) y los estudios piloto de Trasplante autólogo de Células stem sugiere que los pacientes con Escleroderma de progresión rápida puedan beneficiarse usando gran cantidad de inmunosupresores seguido al trasplante autólogo de células stem logrando un cambio inmunológico en el paciente frenando así la progresión de la enfermedad (174).

La Movilización de células hematopoyéticas se logra con Ciclofosfamida 2 gr/ m² por dos días asociado a factor estimulante de colonia granulocito 10 µg/ Kg /día. Posterior de los cual se selecciona las células CD 34 + pro medio de leucoféresis y con numero limitado de células CD 3 + con una pureza de 96%. El acondicionamiento se realizo con ciclofosfamida 200 mg /kg y globulina anti timocito de conejo 7.5 mg/Kg.

Aunque las experiencias piloto iniciales con el trasplante de células stem mostraron una TRM mas alta a la esperada tras el trasplante, se han intensificado los criterios de elección y se han hecho modificaciones a los regímenes para que el estudio SCOT reduzca el riesgo de mortalidad.

3.3.2.3 Resultados

En el estudio piloto se enrolaron 34 paciente, con una sobrevida de 79% a un año, con un mortalidad probable de 36%. Dentro del compromiso cutáneo observaron una mejoría de más del 25% en los criterios de Rodnan 30.12 a 22.08, mínima mejoría en el volumen vital forzado, estabilización de la fibrosis pulmonar a un año.

6 paciente tuvieron reactivación de la enfermedad pulmonar con posterior muerte por la misma causa. Los anticuerpos Anti-Scl 70 fuero negativos 6-8 meses. 4 pacientes requirieron diálisis por crisis renal esclerodermia asociada 3 de los cuales murieron y 1 sobrevivió pero requirió diálisis por 20 meses. Las posibles causas que originaron las defunción de los pacientes se hallan por sepsis con Virus Epstein Barr, falla renal, arritmias cardíacas, falla multiorgánica, síndrome mielodisplásico y neumonitis asociada a esclerodermia (142).

3.3.3 JAPONESES

Siguiendo los parámetros de investigación de los grupos formados en América y Europa (ASTIS/SCOT); se creó en Japón un grupo investigativo dirigido por Dr. H. Tsukamoto; inicio estudios fase I/II con el fin de describir la respuesta generada por el trasplante de células madre hematopoyéticas en enfermedades auto inmunes (193).

3.3.3.1 Estudio clínico

En el estudio se enrolaron 8 paciente; 6 de los cuales padecían esclerodermia sistémica difusa, 1 dermatomiositis amioipática refractaria y 1 granulomatosis de Wegener. El protocolo de movilización y acondicionamiento utilizado fue similar al empleado por el grupo ASTIS sin incluir la globulina antitimocito (ATG).

3.3.3.2 Resultados

Los resultados obtenidos fueron; 3 hombres y 5 mujeres. 5 de los 6 pacientes con esclerodermia con positividad de anti cuerpos anti Scl70. Se encontró mejoría de los criterios Rodnan medidos a los 3, 6, 12 meses sin recurrencia de a los 28 meses de seguimiento. Se encontró mejoría leve de los parámetros de medición pulmonares (193).

3.3.4 OTROS

Vonk y colaboradores (2008) realizaron seguimiento a 26 pacientes con sSSc que fueron sometidos a HSCT después de recibir 50mg/kg/día de CY durante 4 días; la edad media fue de 42 años. Se encontró que dos pacientes incluidos en el estudio habían violado los criterios de inclusión y sus resultados se incluyeron en el análisis. 12 pacientes tenían SSc difusa temprana con una media de duración de enfermedad de 1.4 años; 14 pacientes tenían SSc progresiva con compromiso de órganos y una media de duración de la enfermedad de 3.7 años. 2 pacientes (7.1%) murieron después de seis meses del procedimiento. La probabilidad de supervivencia a 5 años es de 96.2% y a 7 años es de 84.8%; la media de seguimiento fue de 5.2 años con una TRM de 8%. La tasa de supervivencia libre de enfermedad en los últimos seis meses de seguimiento luego del trasplante fue de 64.3% a 5 años y 57.1 a 7 años. A su vez Vonk y colaboradores notaron que el HSCT tenía gran efecto sobre el tratamiento esta deducción se tomó del estatus funcional planteado por OMS de esta forma a 5 años del trasplante 56% se hallan en grado

0 en comparación a 4% en el inicio del estudio (Dato basal). Indiscutiblemente la evidencia de mayor impacto al HSCT es la disminución en el compromiso cutáneo medido con el índice de Rodnan modificado alcanzando una media de 4 y 3 puntos a 5 y 7 años respectivamente (media mRSS basal: 32) se pudo estimar que el mRSS decrece a 25% al primer año del HSCT y en un 94% a 5 años. En términos generales el 83% de los pacientes mostraron respuesta positiva al tratamiento (125).

Oyama y colaboradores en 2007 reportó la fase I del trial que evalúa el uso de un acondicionamiento no mieloablativo y aHSCT en 10 pacientes con SSc con mal pronóstico; aquí solo 1 paciente tuvo mRSS <23, la media de mRSS era de 30.5. En este estudio todos los pacientes presentaban compromiso pulmonar, gastrointestinal, fenómeno de Raynaud; 4 pacientes tenían trazas de proteinuria y 8 de los pacientes se les halló anomalía en ECG. La edad media de los pacientes fue 46.5 años. La media de seguimiento tras el aHSCT fue de 25.5 meses en la cual 9 de los 10 pacientes permanecían con vida; al igual que en la mayoría de estudios la variable mRSS mostró ser estadísticamente significativa al compararse los valores basales pre HSCT y post HSCT (P: 0.008 a 6 meses, 0.004 a 12 meses y 0.06 a 2 años). La función cardíaca seguida con fracción de eyección y presión arterial pulmonar; la función pulmonar seguida con DLCO y la función renal seguida con creatinina se estabilizaron sin cambios estadísticamente significativos. Transcurridos los 25.5 meses de seguimiento la tasa de supervivencia fue de 90% y PFS fue de 70%. Los autores notaron que el régimen no mieloablativo con aHSCT arroja resultados satisfactorios en el compromiso cutáneo sin la toxicidad del régimen de acondicionamiento mieloablativo usando TBI (6).

Nash y colaboradores en el 2007 reportaron resultados de la fase II del estudio simple de altas dosis de terapia inmunosupresora con aHSCT en 34 pacientes con SSc, con selección CD34+ "single-arm study of high-dose immunosuppressive therapy and autologous HSCT", allí se evidenció respuesta en 63% de los pacientes a 4 años, la mejoría cutánea fue la más relevante en cuanto a textura y función igualmente se mostró una TRM de 23% con una muerte relacionada a enfermedad del 12%. Tanto la tasa de supervivencia como la PFS fueron de 64% (142).

Ina Koetter, MD, y colaboradores del hospital universitario Tuebingen -Alemania-, reportaron las fases I y II de un estudio piloto con células progenitoras autólogas de sangre periférica (aPBSC) en 15 pacientes con enfermedad autoinmune resistentes a tratamiento (9/15 con SSc) e estudio reportó que 8/9 pacientes con SSc mostraron remisión parcial y 2/4 pacientes

con vasculitis remisión total de la enfermedad relacionado con elevado riesgo de infección viral post HSCT (104).

Hiroshi Tsukamoto, MD y colaboradores –Japón- examinaron la reconstitución inmune luego de la terapia inmunosupresora con altas dosis de CY y aPBSCT en pacientes con SSc; ellos reportaron que el tratamiento es efectivo a largo plazo ya que este a su vez provee supresión de LT CD4 y corrección del desbalance de citoquinas (195).

Recientemente se ha comunicado la experiencia francesa en SSc refractaria en un ensayo en fase I-II (ISAMAIR) en 12 pacientes; aquí 11 pacientes las stem cell se obtuvieron de sangre perifera y 1 solo de medula ósea. En este estudio solo 1 paciente falleció a los 10 meses del procedimiento, 8 de los 11 restaron mostraron respuesta mayor y parcial satisfactoria (64).

3.4 HSCT, MSC y ESCLERODERMA

En términos generales el HSCT en pacientes con desordenes autoinmunes severos refractarios a tratamiento convencional han respondido a altas dosis de quimioterapia y trasplante autólogo de células stem hematopoyéticas; post-HSCT se ha observado disminución del proceso fibrótico de la piel en SSc, y ayuda en otras patologías de etiología autoinmune tales como esclerosis múltiple (ES), artritis idiopática juvenil (JIA) y artritis reumatoide (AR); al igual se evidencia normalización en el recuento de plaquetas en pacientes con trombopenias autoinmunes (7).

Recientes estudios plantean emplear las propiedades de las células stem mesenquimales (MSCs) en la inhibición de la respuesta y activación de las células T inducida por mitógenos y aloantígenos; por lo tanto el uso conjunto de HSCs y MSCs ampliarían los efectos del trasplante de células stem en pacientes refractarios a tratamiento convencional.

Los mecanismos inmunomoduladores empleados por las MSCs han sido estudiados y probados en modelos In vitro demostrando inhibición de células del sistema inmune, por lo tanto; suprime la respuesta inmunitaria. El repertorio por el cual la MSC logra la inhibición consta de varios elementos incluyendo contacto celular y síntesis de factores solubles como la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), TGF- β 1, prostaglandina E2, factor de crecimiento de hepatocitos y síntesis de algunas citoquinas (46, 107, 136, 146,155).

C. Bocelli-Tyndall et. Al 2005. Investigaron la habilidad de las MSCs derivadas de medula ósea (BM-MSCs) en la supresión proliferativa de linfocitos estimulados de pacientes con enfermedades autoinmunes (AD) empleando BM-MSCs autólogas y BM-MSCs de donadores sanos. El estudio a su vez evaluó la habilidad supresora en la proliferación In Vitro de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) autólogas y alogénicas estimuladas con anticuerpos anti-CD3 o uso combinado de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28; en pacientes sanos y pacientes con diversas enfermedades de etiología autoinmune. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Las BM-MSCs provenientes de donadores sanos y pacientes con AD redujeron la proliferación de células mononucleares de sangre periférica PBMCs autólogas y alogénicas; a su vez la inmunosupresión era independiente del grado de proliferación de (PBMCs) e independiente de la actividad clínica de la enfermedad autoinmune. Por lo tan concluyeron que las MSCs poseen una gran propiedad anti-proliferativa contra linfocitos en diferentes condiciones, mostrando potencial para usarles como terapia celular inmunomodulatoria en AD (196).

Rasmusson et. al (2004). Observaron que las MSCs inhiben la proliferación In Vitro de linfocitos T estimulados con mitógenos y aloantígenos e In Vivo prolonga la supervivencia de injertos de piel. Igualmente analizaron el perfil de citoquinas de Linfocitos provenientes de sangre periférica co-cultivadas con MSCs; encontrando aumento en IL-2 y Receptor de IL-2 soluble en cultivo mixto de linfocitos (MLCs) mientras que los niveles de IL-2 y Receptor IL-2 soluble decrecía en el cultivo de linfocitos estimulados con Fitohemaglutinina (PHA); por lo tanto las MSCs inhiben la proliferación inducida por IL-2 en ensayos de blastogénesis usando mitógenos (158). A su vez se hallaron incrementados los niveles de IL-10 en MLCs co-cultivados con 10% MSCs pero no se observaron cambios en los niveles de IL-10 en los cultivos de linfocitos con PHA. Al agregar anticuerpos contra IL-10, en los MLCs inhibidos por MSC hubo arresto de la supresión proliferativa pero no hubo efecto en los cultivos con PHA.

Al adicionar un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas como la Indometacina; se restaura parte de la inhibición ejercida por la MSCs en cultivos de linfocitos estimulados con PHA aunque en los MLCs la indometacina no afecta la inhibición inducida por la MSC. Con estos resultados rasmuson et.al. Concluyeron que sus ensayos indicaban que la supresión inducida por las MSCs consta de un complejo mecanismos que afecta la señalización inducida por IL-2 e IL-10, como varias funciones dependiente de activación de linfocitos T. Igualmente recalca la importante función de las prostaglandinas en la inhibición por la MSC

cuando los linfocitos T son activados con PHA.(158)

3.5 HLA Y EN FERMEADES AUTOINMUNES

El sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), es producto de codificación de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) ubicados en el brazo corto del cromosoma 6; cuya principal función radica en ser moléculas presentadoras de antígeno ante linfocitos. Las moléculas de HLA están divididas en 3 clases (I, II y III) y poseen gran polimorfismo debido a la alta tasa de variabilidad genética del genoma humano, por lo tanto esta variabilidad genética ha sido de gran interés en muchas áreas debido a su papel determinante en la respuesta inmune, como la susceptibilidad o resistencia a un gran número de enfermedades y la supervivencia de los trasplantes de tejidos (162).

En base a lo anterior surgió el análisis molecular de las frecuencias del HLA y la asociación con diversas enfermedades en diferentes subpoblaciones dando paso a la Epidemiología molecular y la inmunogenética (Dorman J; 1994).

4. LABORATORIO

4.1 Cultivo Celular:

Es una técnica empleada para preservar células "in Vitro" manteniendo las propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas de la célula cultivada a través del tiempo. El uso de cultivos celulares es de gran espectro ya que permite observar y evaluar un sin número de procesos celulares e idear nuevas aplicaciones clínicas y científicas de determinados productos y/o sustancias.

El cultivo celular se realiza en base a un proceso previo de disgregación celular por medios mecánicos y/o enzimáticos que darán por resultado final una suspensión celular que se puede cultivar primeramente como una suspensión en un medio de cultivo o mediante monocapas celulares adherentes. La ventaja de los cultivos celulares radica en que este permite la expansión e incremento de la población celular del cultivo a lo largo de las generaciones homogenizando la población en condiciones específicas, es decir; aumenta el número de células con mayor tasa de crecimiento.

4.2 Tripsinización:

Es una técnica de disgregación en placa que permite separar las células de su soporte y entre si mediante el uso de la enzima Tripsina; esta enzima rompe las uniones hechas por las células y el soporte hidrolizando la malla de proteínas que conforman la matriz extracelulares. El proceso debe hacerse con sumo cuidado ya que la tripsina prolongada por mucho tiempo puede hacer digestión y destrucción total de las células.

4.3 Cultivo Mixto de Linfocitos (CML):

Procedimiento *in vitro* que mide reconocimiento y proliferación celular. Descrito por primera vez por Bach y Hirschorn en 1964, y modificado con la introducción de la inactivación de las células estimuladoras por Bach y Voynow en 1966 para crear una reacción en una sola vía.

El ensayo representa la medida funcional de inmunidad celular en el cual los linfocitos ayudadores (CD4) de un individuo son inducidos a proliferar después de estar en contacto con células mononucleares de otro individuo. La señal de activación o estimulación es originada por los determinantes de las moléculas de clase II o región HLA-D que están expresada en las células B y monocitos que están situados en el primer dominio en la tercera región hipervariable de las moléculas HLA II.

Esta activación se manifiesta metabólicamente con incremento de proteínas, síntesis de RNA y DNA y morfológicamente por la transformación de linfocitos pequeños en linfoblastos (Blastogénesis). Las células normalmente alcanzan un pico máximo de síntesis o rata máxima de proliferación de DNA en un periodo de seis días. Las células activadas se dividen y proliferan. Para medir esta actividad se mide la incorporación de Timidina Triteriada al nuevo DNA sintetizado o por técnicas indirectas como ALARM BLUE. La activación de una población celular es medida por el tratamiento de la segunda población con un inhibidor de DNA (Mitomicina C) o irradiación para bloquear la síntesis de DNA. Las células tratadas son llamadas población estimuladora (E) y las células sin tratar son la población respondedora (R) (23).

4.4 Radiación Ionizante

Las radiaciones electromagnéticas (EM), tales como rayos X y rayos Y, pueden ser consideradas como bolsa móviles de energía (quenta) llamadas fotones. Cuando las

radiaciones EM interactúan con la materia biológica, las moléculas o los átomos absorben energía. Los fotones propios de los rayos X son lo suficientemente energéticos como para que sus interacciones puedan producir una dislocación completa de un electrón de su órbita alrededor del núcleo del átomo. Tal átomo queda como una carga positiva y por tanto es un ion, de ahí el término radiación ionizante. Una interacción que transfiere energía pero que no desplace completamente un electrón, produce un átomo o molécula “excitada” y se denomina una excitación. Las partículas incluyen electrones, neutrones, partículas alfa e iones con carga pesada. La interacción de las partículas con la materia consiste en la colisión con el núcleo con los electrones de un átomo. (56)

4.5 Medición proliferación Celular

4.5.1 Técnica Alamar Blue:

El ensayo de Alamar Blue está diseñado para medir cuantitativamente la proliferación de varias líneas celulares humanas y animales, bacterias y hongos. El ensayo incorpora un indicador de crecimiento fluorométrico/colorimétrico basado en la detección de la actividad metabólica. Específicamente, el sistema incorpora un indicador de oxidación-reducción (REDOX) que fluoresce y cambia de color en respuesta a una reducción química de medio de crecimiento resultado de crecimiento celular. (114)

La especificidad (fluorométrica/colorimétrica) de indicador REDOX incorporado en Alamar Blue fue cuidadosamente seleccionado. Primero, el indicador REDOX exhibe cambio colorimétrico y fluorométrico en un apropiado rango de oxidación-reducción relacionado con la reducción metabólica celular. Segundo, el indicador REDOX es mínimamente tóxico para las células. Tercero, el indicador REDOX produce un limpio, estable y fácil cambio de color para interpretar.

La actividad metabólica celular innata resulta en una reducción química de Alamar Blue. El continuo crecimiento celular mantiene un medio reducido mientras que la inhibición de la proliferación mantiene un medio oxidado. La reducción hace que el indicador REDOX cambie de oxidado (no fluorescente, azul) a la forma reducida (fluorescente, roja).

4.6 Ensayo de Blastogénesis

El cultivo mixto de linfocitos es un procedimiento *in Vitro* que mide la capacidad de

proliferación de los linfocitos T pos estímulo con mitógenos. En el caso de proliferación celular se realizó un cultivo de células irradiadas y no irradiadas donde las células no irradiadas se tomaron como control para las irradiadas.

4.6.1 Mitógenos:

Mitógenos se denomina a aquellos agentes capaces de inducir la proliferación de una gran cantidad de clones de linfocitos T y/o B, de modo inespecífico, debido a esto se les conoce como activadores policlonales. Las Lecitinas son las más empleadas; estas conllevan la aglutinación de células y activación policlonal de células T, B, o de ambas, un ejemplo de ellas es la concanavalina A “conA” (mitógeno de células T) fitohemaglutinina “PHA” (mitógeno de células T), mitógeno de fitolaca “PWM”(mitógeno tanto de T como de B) y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas cuya actividad como mitógeno reside en la porción de lípido A.

Fitohemaglutinina (PHA): La PHA integra la fracción proteica de las semillas del frijol colorado común *Phaseolus vulgaris*; aglutina tanto hematíes como leucocitos, se une a determinados oligosacáridos y estimula la mitosis en diferentes estirpes celulares. El efecto mitogénico de esta lecitina incremento sus aplicaciones por lo que en la actualidad se emplea como Factor estimulante de la proliferación en cultivos de diferentes estirpes celulares, incluidos los linfocitos actuando sobre los procesos bioquímicos relacionados con la respuesta inmune (35, 62, 100-101,111).

4.7 Criopreservación Celular

Las células pueden ser preservadas en nitrógeno líquido, donde su actividad metabólica y enzimática es cero, almacenadas indefinidamente sin perder viabilidad si se utiliza un medio correcto y una técnica de congelación y descongelación adecuada. Los criopreservativos deben ser altamente solubles en agua y baja toxicidad para las células estas son clasificados de acuerdo a su capacidad de penetración celular. Dentro de los penetrantes se tiene el dimetil-sulfóxido, glicerol (BP-UP), etilenglicol, metanol, dimetilacetamida, y dentro del grupo de los no penetrantes están el PVP (polivinilpirrolidona), HES (hidroxietil almidón), dextranos, albúmina y polietilenglicol, ellos son adicionados para prevenir el daño celular durante el proceso debido principalmente a la formación de cristales de hielo de tamaño grande y a cambios osmóticos.

III. FORMULACION DE PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

5.1 Planteamiento de Problema

El Trasplante de células Stem (SCT) ha sido empleado desde el año 1996 como terapia potencial para el tratamiento de enfermedades de etiología autoinmune tales como: Esclerosis Sistémica, Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico. Aunque su uso se encuentre reservado a pocos grupos a nivel mundial (ASTIS, SCOTT, entre otros); la necesidad por entender los mecanismos empleados por las células Stem ha llevado en la última década al desarrollo continuo de investigaciones e instauración de protocolos con el fin de ser aprovechados en un futuro muy cercano.

Las células Stem empleadas en el SCT son las Células Stem Hematopoyéticas (HSC); los protocolos de movilización y trasfusión de las misma ya se encuentran validados para las enfermedades anteriormente mencionadas. En este aspecto; el Grupo Europeo de Trasplante Hemopoyético y La Liga Europea Contra el Reumatismo (EBMT/EULAR), en colaboración directa con el grupo ASTIS demostraron factibilidad y seguridad en los procesos de autotrasplante para pacientes con Esclerosis Sistémica de mal pronóstico que son refractarios al tratamiento convencional, evidenciando mejoría con obtención de remisiones totales y parciales en 90-92% de los pacientes tratados con Trasplante Autólogo de Células Stem Hematopoyéticas.

Actualmente se está estudiando la posibilidad de usar otro tipo de células stem que potencialicen este tratamiento; las Células Stem Mesenquimales apuntan a ser las candidatas perfectas debido a su demostrado potencial inmunomodulador en ensayos In Vitro, por lo tanto la aplicación de estos modelos In Vivo darían una nueva luz en la remisión de pacientes con enfermedades autoinmunes.

5.2 Justificación

La Esclerosis Sistémica (SSc) es una enfermedad autoinmune crónica de tejido conectivo; ésta patología en la actualidad representa un gran reto a nivel clínico y terapéutico debido al incremento de pacientes refractarios a los tratamientos convencionales llevando así, al aumento de la morbimortalidad de la enfermedad. Los pacientes con Esclerosis Sistemica tienen una tasa de mortalidad a 5 años de 30%; a su vez se estima que los pacientes con esclerosis sistémica severa u progresiva tiene una tasa de mortalidad a 5 años de 45-50%; por tal razón es de suma importancia ampliar el estudio de la fisiopatología de la enfermedad para poder estructurar bases sólidas en la instauración de nuevas terapéuticas.

Aunque dista de ser una terapia perfecta para el manejo de pacientes con enfermedades autoinmunes (AD) se ha planteado el uso del Trasplante de Células Stem Hematopoyéticas (HSCT) como una nueva estrategia terapéutica; el HSCT debe ser implementado en Colombia en sus inicios con aquellos pacientes con AD que muestren una rápida progresión de la enfermedad en la cual la terapéutica convencional no puede contrarrestar la carga de la enfermedad y así mejorar la tan deteriorada calidad de vida de los pacientes. Al emplear el trasplante de células stem en enfermos con SSc se ha observado como éste logra remisión de la enfermedad facilitando el manejo de la misma con terapia convencional Post-HCST.

Por tal razón; en los últimos años se ha visualizado el papel que poseen las Células Stem Mesenquimales (MSC) en el reajuste de la tolerancia inmunológica en pacientes con AD; los avances en el conocimiento del protagonismo de las MSC cultivadas ex-vivo para modular la respuesta inmune, es una de las principales razones por la cual se sugiere su uso en pacientes llevados a HSCT, ya que lograría aumentar tolerancia contra lo propio disminuyendo conjuntamente el índice de actividad de la enfermedad. Teniendo en cuenta lo anterior se buscó a través de este estudio evaluar el poder inmunosupresor que ejerce la MSC sobre los linfocitos T de pacientes colombianos con SSc provenientes del altiplano Cundí-boyacense estimulados con mitógenos y aloantígenos, así como la asociación de la enfermedad con el sistema HLA.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Medir la inhibición de proliferación de linfocitos T estimulados con aloantígenos y mitógenos de pacientes colombianos con esclerosis sistémica por medio de células stem mesenquimales.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1 Identificar alelos HLA asociados con la enfermedad en pacientes Colombianos con Esclerosis Sistémica
- 2 Describir la técnica de obtención de células Mesenquimales.
- 3 Caracterizar las células Mesenquimales por Citometría de flujo.
- 4 Describir la técnica de obtención y cultivo linfocitario en pacientes con SSc.
- 5 Obtener un co-cultivo celular entre linfocitos y células mesenquimales
- 6 Describir la relación efectiva in vitro de células mesenquimales con linfocitos T a la cual se obtengan diferentes grados de inhibición.
- 7 Comparar la respuesta linfocitaria de pacientes con SSc con células Mesenquimales de Controles sanos y pacientes SSc.

7. HIPOTESIS

- Existe una inhibición de la proliferación de células T de la pacientes colombianos con Esclerosis Sistémica (Ssc) cocultivadas con células mesenquimales alogenicas, frente a mitógenos y células aloreactivas.
- No existe una inhibición de la proliferación de células T de la pacientes con SSc cocultivadas con células mesenquimales frente a mitogenos y células aloreactivas.

IV. DISEÑO METODOLOGICO

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Diseño de Investigación

El presente estudio se desarrollo bajo dos modelos: Observacional y cuasi-experimental. El estudio se dividió en tres fases; en la primera fase se seleccionaron pacientes con SSc a los cuales se les realizo Tipificación de HLA por Biología Molecular, seguido de la recolección de datos de HLA de individuos sanos pertenecientes al Programa de Trasplante del HOMIC y los exámenes de seguimiento y diagnóstico de SSc (ANAS, ENAS, ScI70, ACAS, APL). En la segunda fase se obtuvieron las Células Mesenquimales provenientes del banco de Células Stem; en la tercera y ultima hizo caracterización fenotípica de las células mesenquimales previo al co-cultivo y ensayo de blastogénesis frente a Conca-A y células T alogénicas

8.2 Población del Estudio

La población blanco fueron aquellos pacientes con SSc del Hospital Militar Central que cumplieron con los criterios de ACR y asistieron a consulta del servicio de reumatología entre Marzo y Octubre de 2008. La población accesible y elegibles fueron aquellos pacientes con SSc tratados en el HMC en este periodo.

Este ensayo fue realizado en el Hospital Militar Central con la colaboración de los servicios de Inmunología-Reumatología, Hematología Especial; el Banco Colombiano de Células Stem y el servicio de Hematología de EPS Saludcoop

MUESTRA

Se realizó un muestreo por conveniencia a partir de los pacientes que asistieron al Hospital Militar Central; la selección de linfocitos de los pacientes con Dx de SSc se realizo de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión planteados en cada una de las fases del estudio.

8.3 Criterios de Elección Muestras:

8.3.1 Obtención MSC

Criterios de inclusión

- Muestras de aspirado de medula ósea mayores de 18 años de edad,
- Que asistieron al servicio de hematología del Hospital Militar Central entre Marzo y Septiembre del 2008, eligiendo aquellas muestras a las cuales se les excluyó neoplasias hemato-oncologicas.
- Que aceptaron participar voluntariamente mediante firma del consentimiento informado

Criterios de exclusión

- Pacientes con dudas diagnosticas sobre el tipo de compromiso de su enfermedad.
- Pacientes con enfermedades virales como Hepatitis B, Hepatitis C y VIH.
- Pacientes diagnosticados con coagulopatias congénitas (hemofilia)
- Pacientes que presentan infecciones bacterianas.

8.3.2. Obtención CMN

Selección de pacientes con y sin enfermedad autoinmune; es decir pacientes con Esclerosis Sistémica y controles sanos. Se obtuvieron muestras de sangre total mediante venopunción en tubo estéril con heparina y anticoagulante EDTA en servicio de reumatología del Hospital Militar Central

Criterios de Inclusión

- Pacientes mayores de 18 años con diagnostico confirmado de Escleroderma por los criterios del ACR, independientemente del tiempo de evolución y tratamiento recibido
- Controles: Individuos clínicamente sanos mayores de 18 años
- Que acepten participar voluntariamente mediante firma del consentimiento informado

Criterios de exclusión

- Pacientes con infección bacteriana.
- Pacientes con enfermedades virales como Hepatitis B, Hepatitis C y VIH.

8.4 Variables del Estudio

Dependientes: Asociación de HLA
 Porcentaje de inhibición de aloreactividad
 Porcentaje de inhibición de mitogenicidad
 Porcentaje de inhibición dependiente de la relación MSC utilizada

Independientes: Sexo, Edad, Clase social, Antecedentes clínicos, Tiempo de morbilidad, Tratamiento, paciente SSc, control.

9. MEDICIONES E INSTRUMENTOS

9.1 Esquema de Trabajo

ESQUEMA DE TRABAJO

Primera Fase (Inmuno diagnóstico):

1. Tipificación de HLA por PCR de pacientes con SSc y Controles sanos.
2. Cuantificación de ANAS, ENAS, Scl-70 y ACAS en pacientes SSc

Segunda Fase (Inmuno Experimental):

1. Obtención de MSC de Medula Ósea
2. Cultivo, Purificación y Congelamiento de MSC
3. Caracterización y Viabilidad de Células Mesenquimales por Citometría de Flujo
4. Descongelamiento de MSC

Tercera Fase (Inmuno Experimental):

1. Obtención de CMN de pacientes y controles sanos
2. Irradiación de CMN y MSCs
3. Ensayo de Blastogénesis (Evaluando la Respuesta de células T del paciente con SSc en

cocultivo in vitro con MSC alogénicas en las siguientes diluciones: 1:1; 1:10 y 1:100 frente a Mitógenos y Células T alogénicas.)

9.2 Reactivos y Técnicas

9.2.1 Suplementos:

9.2.1.1 Preparación del medio de cultivo DMEM-LG

9.2.1.1.1 Equipos y materiales

- Cámara de flujo vertical
- Filtros de 0.20 µm
- Frascos Scott de 1L
- Tubos Falcón
- Pipetas Pasteur
- Balanza
- Agua destilada

9.2.1.1.2 Reactivos

- Medio DMEM-LG (SIGMA)
- HEPES (SIGMA)
- Bicarbonato de Sodio
- Antibiótico (Penicilina, Estreptomina, anfotericina)

9.2.1.1.3 Preparación de Medio de Cultivo DMEM-LG

Para preparar un volumen final de 1L de DMEM-LG:

- 1L de agua destilada
- 10g/L de DMEM-LG (SIGMA)
- 3,7g/l de bicarbonato de sodio
- 12,96g/L de HEPES (SIGMA)
- 4mMol/L de L-Glutamina

Finalmente, se filtra el medio empleando filtros estériles con membrana de 0.20 µm en una botella estéril de 1L y se conserva en un sitio estéril a 4°C. Manteniendo un pH

constante de 7.2 -7.4

9.2.1.2 Preparación de DMEM-LG con LPRP al 10%

9.2.1.2.1 Equipos y materiales

- Cámara de flujo vertical
- Filtros de 0.20 µm
- Frascos Scott de 1L
- Tubos Falcón
- Pipetas Pasteur
- Balanza
- Agua destilada

9.2.1.2.2 Reactivos

- Medio DMEM-LG (SIGMA)
- HEPES (SIGMA)
- Bicarbonato de Sodio
- Antibiótico (Penicilina, Estreptomina, anfotericina)
- Lisado de Plasma Rico en Plaquetas (LPRP)

9.2.1.2.3 Preparación de LPRP

Las bolsas de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) fueron donadas por el Banco de Sangre del Hospital Militar Central, las bolsas de PRP cumplían y poseían el sello nacional de calidad. Trascorrido el tiempo agitación continua por 72 horas a temperatura ambiente fueron congeladas a -80°C y se trasladaron al Banco de Células Stem de Colombia en nevera de icopor a temperatura ambiente; allí fueron expuestas a choque térmico continuo oscilando la temperatura de PRP entre -80°C y 37°C (2- 3 veces). Culminado el choque térmico se transfiere el contenido de las bolsas de PRP en un tubo falcón de 50 ml, se centrifuga a 1800 revoluciones por 15 minutos, se recolecta el sobrenadante y se refrigera a -30°C.

9.2.1.2.4 Preparación de DMEM-LG con LPRP al 10%

Para preparar un volumen final de 100ml de DMEM-LG suplementado con LPRP al 10%:

- 89ml de solución de DMEM-LG (Citado 9.2.1.1)
- 1ml de antibiótico; Penicilina/Estreptomina 10000UI/ml y 0.25µg/ml Anfotericina B
- 10mL de LPRP

Conservar a una temperatura de 4°C, manteniendo un pH constante.

9.2.1.3 Preparación de medio de cultivo RPMI II para Linfocitos

9.2.1.3.1 Equipos y materiales

- Cámara de flujo vertical
- Filtros de 0.20 µm
- Frascos Scott de 1L
- Tubos Falcón
- Pipetas Pasteur
- Balanza
- Agua destilada

9.2.1.3.2 Reactivos

- Medio RPMI 1640
- Lisado de Plasma Rico en Plaquetas (LPRP)
- Antibiótico (Penicilina, Estreptomina, anfotericina)

6.2.1.3.3. Preparación del medio de cultivo RPMI II

El MEDIO RPMI II en polvo es extremadamente higroscópico por lo cual debe ser protegido del medio ambiente y no se recomiendan preparaciones de concentraciones mayores a las especificadas. El medio RPMI II es un medio de mantenimiento y viabilidad celular empleado en el cultivo Linfocitos T.

- Medir 90% del volumen final a ser preparado de agua tri-distilada (15 - 20°C).
- Adicionar lentamente el polvo agitando constantemente. No calentar el agua.
- Después que el polvo este disuelto, se agregan 2,0g de bicarbonato de sodio al 5,6% por litro.
- Se adiciona antibióticos y/o otras sustancias que crea que sean necesarias.

- Para obtenerse el pH de acuerdo a lo deseado, se ajusto con HCl 1N o NaOH 0,1N o gasificando con CO₂.
- Se completo el volumen con agua tri-distilada y esterilizando por filtración en membranas de 0,22m, utilizando presión positiva.

9.2.1.4 Preparación Medio de cultivo RPMI con LPRP al 10%

Para la preparación del medio RMPI II suplementado con LPRP 10% se necesita:

- 89ml de RPMI (Citado 9.2.1.3)
- 10 ml de LPRP
- 1ml de antibiótico; 10000UI/ml de Penicilina/Estreptomina y 0.25µ de Anfotericina B

9.2.2 Protocolos:

9.2.2.1 Aislamiento de MSC y Cultivo Celular de CMN Provenientes de Medula Ósea

9.2.2.1.1 Equipos y Materiales

- Cámara de Flujo Vertical
- Tubos Heparina
- Agujas para aspirados de Medula ósea
- Centrifuga refrigerada
- Solución Salina
- Tubos Falcón
- Tubos eppendorf
- Pipetas pasteur
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Cajas de Cultivo T25

9.2.2.1.2 Reactivos

- Ficoll-Hypaque
- Medio DMEM-LG

- Lisado de Plasma Rico en Plaquetas (LPRP)
- Antibiótico (penicilina, estreptomina, anfotericina B)
- Azul tripan

9.2.2.1.3 Aislamiento de Células Mononucleares (CMN) de Medula Ósea

1. Diluir la muestra de aspirado de médula ósea heparinizada 1/3 con solución salina
2. Separar la capa de mononucleares por gradiente de densidad Fycoll–Hypaque (Linfoblot) estéril (1:3 Ficoll: Sangre), en tubos falcón estériles (Becton Dickinson) de 15 ml centrifugando a 1800 rpm 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Recolectar la capa de mononucleares, sin dañar la interfase y transferirla en tubos eppendorf de 1.5ml, y centrifugar a 2500 revoluciones por 15 minutos
4. Lavar las células 2 veces con DMEM-LG (medio de cultivo):
 - Primer lavado a 2500 revoluciones por 15 minutos, decantar el sobrenadante, resuspender el pellet en 1ml de DMEM-LG.
 - Segundo lavado a 2000 revoluciones por 10 minutos.
5. Resuspender el pellet obtenido en 1ml de DMEM-LG; realizar recuento celular y viabilidad en cámara de Neubauer con Azul Tripan (dilución1:2).

- **Número de Cél. Vivas** = Promedio de Células vivas $\times 2 \times 10.000$

- **Número de Cél. Muertas** = Promedio de Células muertas $\times 2 \times 10.000$

- **% Viabilidad**=
$$\frac{\text{Número Total de células Vivas} \times 100}{\text{Recuento Total de células (Vivas y Muertas)}}$$

9.2.2.1.4 Cultivo de Células Mononucleares (Células Mesenquimales)

Al obtener la fracción de CMN de médula ósea de donantes sanos, se procedió a hacer aislamiento de la población MSC mediante la eliminación de células no adherentes dos días post siembra y iniciando así la expansión celular de MSC. La densidad celulares de resiembra que se ensayaron fueron de $5 \times 10^3 \text{ MSC/cm}^2$.

1. Realizar registro de cada una de las células que se cultiven con el objeto de hacer inspección y seguimiento continuo anotando las apreciaciones observadas (Anexo A.3).

2. Adicionar el mililitro (1 ml) de células resuspendidas en DMEM-LG, en una placa T25 con 3ml de DMEM-LG suplementado con LPRP al 10%, e incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ (Fase de Adherencia a plástico por la Célula Mesenquimal).

3. Lavar las células y cambiar medios cada tercer día durante 15 días o tiempo requerido, el lavado se realiza con 5ml de PBS libre de calcio y magnesio pre-calentado a 37°C; adicionando nuevamente 5ml de DMEM-LG suplementado con LPRP al 10%, llevando a incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

9.2.2.2 Disociación enzimática (Tripsinización):

9.2.2.2.1 Materiales y equipos

- Cámara de Flujo Vertical
- Microcentrífuga refrigerada
- Solución Salina
- Tubos eppendorf
- Pipetas pasteur
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Cajas de Cultivo T25
- Incubadora CO₂

9.2.2.2.2 Reactivos

- Enzima Tripsina 0,25%
- EDTA 3mM
- DMEM-LG
- DMEM-LG suplementado 10% LPRP
- Azul Tripán

9.2.2.2.3 Protocolo de Tripsinización

1. Retirar el sobrenadante de la placa T25 y agregar 500µl de solución enzimática (0.25% Tripsina, 0.3mM EDTA).
2. Dejar en incubación a 37°C durante 30 minutos agitando cada 5 minutos.
3. Retirar el sobrenadante de cada pozo en tubos eppendorf.
4. Neutralizar la acción enzimática con 500µl con DMEM-LG suplementado con LPRP al 10%.
5. Centrifugar las células a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante sin dañar el pellet.
6. Resuspender el botón celular con 500µl de DIMEM-LG sin suplementar.
7. Realizar los recuentos en cámara de Neubauer con Azul Tripán (dilución ½). Mantener las muestras en la incubadora hasta el momento de realizar el recuento celular.
8. Hacer cultivo celular citado en el numeral 9.2.2.1.4

9.2.2.3 Caracterización fenotípica MSC

9.2.2.3.1 Protocolo de Caracterización de MSC:

- 1 Se caracterizo la expresión de diferentes proteínas de membrana en las MSCs cultivadas mediante la determinación citométrica de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos. El perfil fenotípico que se ensayo fue:
 - Anticuerpos Monoclonales anti: CD105 (SH2) (PE, Becton Dickinson), CD73 (FITC, Dako), CD45 (FITC, Becton Dickinson)/CD34 (PE, Dako), CD14 (FITC, Becton Dickinson), HLA-DR (PE, Dako), CD 133 (APC, Dako).

9.2.2.4 Aislamiento de CMN de Sangre Periférica

9.2.2.4.1 Equipos y Materiales:

- Cámara de Flujo Vertical
- Tubos EDTA
- Centrifuga refrigerada

- Solución Salina
- Tubos eppendorf
- Pipetas pasteur
- Cámara de Neubauer
- Microscopio

9.2.2.4.2 Reactivos:

- Ficoll-Hypaque
- Azul tripan
- RPMI II
- RPMI II con LPRP al 10%

9.2.2.4.3 Aislamiento CMN de Sangre Periférica:

1. Obtener 10 ml de sangre venosa en tubos EDTA
2. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos
3. Separar la capa de blancos y diluirlos $\frac{1}{2}$ con solución salina.
4. Separar la capa de células mononucleares por gradiente de densidad Fycoll–Hypaque (Linfoblot) estéril (1:3 Ficoll: Sangre), en tubos falcón estériles (Becton Dickinson) de 15 ml centrifugando a 1800 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Recuperar la capa de CMN y transferirlos a un tubo eppendorf, lavarlos 2 veces con solución salina a 3000 rpm por 3 minutos.
6. Resuspender el pellet a 1 ml con RPMI II (Citado 9.2.1.3)
7. Hacer recuento celular y viabilidad.
8. Reajustar la concentración de CMN a 0.5×10^6 CMN/ml

9.2.2.5. Criopreservación Celular CMN/MSC

9.2.2.5.1 Materiales y Equipos

- Cámara de Congelación Nitrógeno Líquido
- Pipetas Automáticas
- Pilas refrigeradas
- Cronometro
- Cámara de Neubauer

9.2.2.5.2 Reactivos

Solución Congelante: Preparar 60% RPMI II sin suplementar

20% LPRP

20% Dimetil-Sulfóxido (DMSO)

Nota: Para congelar MSCs se emplea el mismo protocolo y proporciones, en vez de RPMI II se emplea DMEM-LG.

9.2.2.5.3 Protocolo de Criopreservación Celular

9.2.2.5.3.1 Congelación

1. Preparar los linfocitos que se van a congelar y ajustarlos a la concentración deseada. Generalmente se recomienda congelar entre 5 a 20 millones Células/ml.
2. Adicionar la cantidad de solución congeladora necesaria, gota por gota mezclando continuamente.
3. Rápidamente distribuya 1 ml a los tubos de congelación.
4. Coloque los tubos de congelación a -70°C , por dos días y luego transfíralos a un tanque de nitrógeno líquido.

9.2.2.5.3.2 Descongelación

Opción 1:

1. Extrae la bala del termo de nitrógeno líquido, y se sumerge con agua entre 40 a 45°C , mezclándose cuidadosamente.
2. Pasar la suspensión a un tubo estéril y se adiciona medio de cultivo celular RPMI 1640 (2,5 ml aprox.) con 10% de SFB. Para evitar el daño osmótico celular.
3. Centrifugar a 1800 rpm por 10 minutos; chequear número de células y viabilidad
4. Ajustar a la concentración deseada.

Opción 2:

1. Remover las células del congelador o el tanque de nitrógeno. Dejar que se descongelen en baño María a 37°C .

2. Colocar rápidamente en un tubo y adicionar 0.4 ml de DNAsa, para una concentración de células de 1-10 millones/ml.
3. Incubar en baño maría por 5-7 minutos.
4. Descartar sobrenadante y lavar con medio RPMI II (2 veces).
5. Contar, chequear viabilidad y ajustar a la concentración deseada.

9.2.2.6 IFI – ELISAS

Muestra empleada: Suero

9.2.2.6.1 ANAS- IFI / Hep 2000

9.2.2.6.1.1 Equipos y Materiales:

- Suero paciente SSc
- Pipetas Automáticas
- Pipetas pasteur
- Envase estéril de 1 Litro de capacidad
- Tubos de ensayo
- Lamina portaobjetos con sustrato (Hep -2000® Inmunococepts)
- Papel Secante
- Cubreobjetos de vidrio 24x60 mm
- Microscopio de Fluorescencia

9.2.2.6.1.2 Reactivos

- Kit sistema de análisis de ANA-Ro por Inmunofluorescencia Hep-2000®
 - Tampón PBS
 - Controles Positivo (SSa/Ro, Homogéneo, Moteado, Nucleolar, Centrómero) y Negativo.
 - Reactivo fluorescente: Anticuerpos fluorescentes IgG conjugada con FITC.
 - Medio de preparación semipermanente.

9.2.2.6.1.3 Procedimiento y Montaje

1. Preparar el tampón (PBS) disolviendo el contenido de (1) bolsa PBS en un Litro de agua destilada.
2. Realizar dilución de la muestra del paciente 1/40, 1/80, 1/160, progresivamente.

3. Agregar 25 µl de control positivo, control negativo y muestras cuidadosamente sin que la pipeta tenga contacto directo con la lámina portaobjetos. (7 pozos/placa)
4. Incubar la lámina en oscuridad por 30 minutos a T° ambiente en cámara húmeda.
5. Enjuagar el contenido de los pozos con PBS
6. Lavar la lamina por 10 minutos en una placa de tinción con PBS agitándola de forma suave y constante. (2 veces)
7. Secar cuidadosamente la lamina con papel secante sin secar ni tocar los pozos.
8. Agregar una gota de Reactivo Fluorescente en c/pozo y llevar a incubar nuevamente por 30 minutos a T° ambiente en cámara húmeda.
9. Enjuagar y lavar 2 veces con PBS. En el último lavado previamente se agregan 5-10 µl de azul de Evans al PBS para hacer contratinción.
10. Secar la lamina con papel secante sin secar ni tocar los pozos.
11. Adicionar 4-5 Gotas de Medio de Preservación semipermanente uniformemente por la superficie de la lámina.
12. Inmediatamente colocar el cubreobjetos (No formar burbujas)
13. Leer en el microscopio de fluorescencia en objetivo 200X identificar fluorescencia positiva o negativa - 400X reconocer patrones y visualización de células mitóticas.
14. Resultado: Positivo → Fluorescencia \geq dilución 1/80
Negativo → Fluorescencia $<$ dilución 1/80

9.2.2.6.2 ELISA – ENAS/ BINDAZYME™

9.2.2.6.2.1 Equipos y Materiales:

- Suero de paciente SSc
- Micropipetas Automáticas
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcón 50 ml.
- Pipetas Pasteur
- Lector de ELISA

9.2.2.6.2.2 Reactivos:

- Kit Inmuno-ensayo enzimático BINDAZYME™ (THE BINDING SITE); Determinación independiente de SSA/Ro, SSB/La, RNP y Sm.
 - Buffer de lavado tipo III (20X)
 - Diluyente de la muestra tipo III

- Pozos con Antígeno a determinar (SSA/Ro→Rojo, SSB/La→Amarillo, RNP→Azul y Sm→Verde).
- Controles Positivos (SSA/Ro, SSB/La, RNP y Sm) y control Negativo.
- Conjugado (Anticuerpo Anti-Ig G Humana con especificidad contra cada uno de los ENAS).
- Sustrato TMB
- Solución Stop.

9.2.2.6.2.3 Procedimiento ENAS

1. Preparar la solución de lavado 1/20 (1 ml de SIn Buffer diluida con 19 ml agua destilada).
2. Diluir la muestra del paciente en un tubo de ensayo; diluir 10 µl de muestra con 1ml de diluyente de muestra (1/100).
3. Agregar 100 µl de control positivo, control negativo y muestra en cada uno de los pozos correspondientes (Según el Ac a determinar).
4. Cubrir los pozos con parafilm e incubar a T° ambiente /30 minutos.
5. Descartar el sobrenadante por inversión de forma rápida sin mezclar el contenido de los pozos.
6. Lavar con 5 gotas de solución lavado por pozo, descartando el sobrenadante.
7. Envolver la placa en papel absorbente para secar los pozos dándole suaves golpes contra una superficie plana.
8. Lavar 2 Veces, dejando los pozos completamente secos.
9. Agregar 100 µl de Conjugado específico en cada pozo cubrir con parafilm e incubar a ° ambiente /30 minutos.
10. Lavar 3 veces y secar los pozos siguiendo los pasos anteriormente mencionados.
11. Agregar 100 µl de sustrato TMB en cada pozo cubrir con parafilm e incubar en cámara oscura 30 minutos a T° ambiente.
12. Transcurridos los 30 minutos agregar 100 µl de Solución Stop a cada pozo esperar 5 minutos y leer en el espectrofotómetro a 450 nm.
13. Interpretación de resultados= Positivo: ≥ 10 U/ml
Negativo: < 10 U/ml

Nota: Las pruebas ACAS y Sci70 son de la misma casa comercial BINDAZYME™ (THE BINDING SITE); por lo tanto se emplea el mismo protocolo empleado en ENAS.

9.2.2.7 Tipificación de HLA por PCR

Prueba realizada en la primera fase de la investigación.

9.2.2.7.1 Equipos y Materiales:

- Cámara de Flujo Vertical
- Centrifuga refrigerada
- Solución Salina
- Sangre pacientes y controles sanos con EDTA
- Congelador/Hielo
- Tubos eppendorf estériles
- Micropipetas
- Termociclador
- Cámara de Electroforesis
- Cámara de lectura

9.2.2.7.2 Reactivos

- Kit para aislamiento de DNA humano (Corpogen):
 - Solución lavado, Tampón de lisis, Solución salina y Solución de reconstrucción.
- Isopropanol grado biología molecular o analítico
- Etanol al 70% (v/v)
- TAC Polimerasa
- Agua Destilada
- Máster mix

9.2.2.7.3 Extracción DNA

1. 2-5 ml de Sangre con EDTA
2. Centrifugar tubo 2500 rpm por 10 minutos
3. Transferir la capa de glóbulos blancos (GB) a un tubo eppendorf
4. Lavar los GB con 1 ml de solución de lavado, agitando suavemente en el vortéx; centrifugando a 14000 rpm por 1 minuto y decantar el sobrenadante (Repetir ≥ 4 Veces), en el ultimo lavado dejar los GB resuspendidos en 20 μ l.
5. Añadir 500 μ l de tampón de lisis mezclando por inversión.

6. Adicionar 500 µl de solución salina, mezclar en el vortéx.
7. Incubar el tubo eppendorf en hielo durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos
8. Transferir 650 µl de sobrenadante a un tubo eppendorf estéril
9. Adicionar 350 µl de Isopropanol mezclándolo por inversión, llevar a centrifugar a 14000 por 5 minutos.
10. Descartar sobrenadante y lavar con etanol 70% el precipitado mezclar y centrifugar a 14000 rpm por 1-2 minutos; en el último lavado descartar el sobrenadante dejando secar el tubo por inversión 1 hora.
11. Adicionar 110 µl de solución de reconstitución; llevar el tubo eppendorf 1 hora a 65°C y luego conservar a 4°C.

9.2.2.7.4 Amplificación de DNA

1. Precalear el DNA extraído en el paso anterior a 60°C por 30 minutos.
2. En un tubo eppendorf estéril de 2 ml agregar 550 µl de H₂O destilada + 440 µl de Máster mix (Biotest ABDR SSPtray) + 10 µl TAC polimerasa (TUQcan polimerasa, Corpogen); mezclar.
3. Sembrar en la placa de amplificación (Biotest ABDR SSPtray) 10 µl de la solución en el pozo control negativo.
4. Adicionar a la solución 110 µl de DNA, y sembrar 10 µl por pozo en los pozos restantes.
5. Sellar la placa con el adhesivo de seguridad
6. Llevar al Termociclador (MULTIGENE Gradient- LABNET) y amplificar durante 1 hora 47 minutos, terminado el tiempo se retira la placa del termociclador y se siembra en gel de agarosa previo corrido electroforético.

9.2.2.7.5 Corrido electroforético e interpretación

1. Sembrar el contenido de cada pozo (10 µl) en cada una de las celdas correspondientes en el gel de agarosa, sembrando en el mismo orden utilizado en el paso anterior.
2. Llevar el gel a cámara electroforética (GEL XL Ultra- LABNET) 18 minutos a 135 volts.
3. Retirar el gel de la cámara.
4. Colorear con Bromuro de Etidio por 20 minutos
5. Revelar la reacción en la cámara de revelado UV (UVITEC) ajustar imagen tomando y

guardando foto.

6. Interpretar según el mapa (Biotest ABDR SSPtray).

9.2.2.8 Cultivo Mixto de Linfocitos

9.2.2.8.1 Equipos y Materiales

- Cámara de Flujo Vertical
- Centrifuga refrigerada
- Solución Salina
- Tubos Falcón
- Tubos eppendorf
- Pipetas pasteur
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- CMN pacientes con SSc y CMN controles sanos

9.2.2.8.2 Reactivos

- Ficoll-Hypaque
- Medio RPMI II
- Medio RPMI II enriquecido con 10% de LPRP
- Azul de Tripán
- Alamar Blue
- Fitohemaglutinina

9.2.2.8.3 Aislamiento de CMN

Se emplean parte de las células Mononucleares (Linfocitos T) indicados en el índice 9.2.2.5.3

9.2.2.8.4 Selección de parejas de linfocitos T alogénicos

Las parejas se seleccionaron en base al HLA de clase II; donde la célula estimuladora debía poseer un HLA-DR diferente al HLA-DR de la célula Respondedora.

9.2.2.8.5 Irradiación celular

1. Antes de llevar las células a irradiar se debe realizar cálculos según lo amerite para precisar las longitudes del recipiente donde se encuentran las células y su dosificación en Gy (*Este proceso debe acondicionarse a temperatura de 37°C*).
2. Resuspender en un tubo Falcon 1 ml de las células en suspensión, preparadas en el proceso de purificación celular, en los cuales uno de ellos se somete al proceso de purificación.
3. Colocar en una gradilla de modo que quede ajustado el tubo Falcon
4. Una vez resuspendidas las células, se calienta agua destilada para sumergir el tubo Falcón junto con la gradilla en el agua.
5. Sumergir los tubos y las gradillas en recipiente de metacrilato. El recipiente debe tener agua a 37°C, el agua debe cubrir el nivel de la suspensión celular.
6. Posteriormente son sometidas al proceso de irradiación donde son irradiadas a una determinada energía y a una dosis adecuada. Dada según los cálculos, que se realizan según la intensidad de Gy con respecto a las longitudes del recipiente donde se encuentran las células a irradiar y su volumen. Se llevan a: 30 Gy – 32 Gy.
7. Una vez irradiadas las células, se monta viabilidad para ver el efecto que ocasionó la concentración Gy en la célula (En el recuento celular se tendrán en cuenta las células vivas y muertas)
 - Se contara los cuadrantes de la cámara de Neubauer se saca el promedio tanto de vivas como de muertas, sumando el número de células que dio en cada cuadrante y se divide por el numero de cuadrantes que se tomo, luego se multiplicara por 2 y ese resultado se multiplica por 10000
 - Se saca el porcentaje correspondiente de células vivas y células muertas, antes y después de la irradiación.
8. Se procederá a la siembra de las células vivas y muertas en placas de cultivo de 96 pozos con fondo en U.

9.2.2.8.6 Co-cultivo de Células

- 1 Colocar las células R (Respondedoras) y E (Estimuladoras) por triplicado en placas de cultivo en U de 96 pozos. Cada pozo recibe 100 µl de estimuladores y 100 µl de respondedoras. (50.000 células de cada población).
- 2 Analizar los Tres tipos de combinaciones:
 - Controles con células irradiadas, conteniendo células estimuladoras de dos diferentes individuos, para chequear la eficacia de la inactivación de proliferación.
 - Combinaciones alogénicas de células respondedoras de un individuo y células estimuladoras de otro individuo.
 - Controles autólogos conteniendo células respondedoras y estimuladoras.
 - Pozos conteniendo células respondedoras y estimuladoras por si sola, solamente con la adición de medio y 20% suero normal humano.
3. Cubrir los cultivos y colocarlos en la incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ e incubar por 6 días (138 horas).

9.2.2.9 Ensayo de Blastogénesis

9.2.2.9.1 Equipos y materiales:

- 1 Cámara de flujo vertical
- 2 Cajas de cultivo de 96 pozos
- 3 Microcentrífuga
- 4 Tubos Falcón
- 5 Tubos eppendorf
- 6 Pipetas Pasteur
- 7 Puntas de 200 µl
- 8 Puntas de 1000 µl
- 9 Pipetas automáticas de 5 a 1000 µl.

9.2.2.9.2 Reactivos:

- 1 Medio RPMI
- 2 Medio RPMI suplementado
- 3 Fitohemaglutinina

9.2.2.9.3 Protocolo de Ensayos de Blastogénesis

- 1 Después de irradiar y verificar la viabilidad celular, se centrifugo la suspensión celular a 1500 rpm a 10 minutos, de células estimuladoras y respondedoras.
- 2 Resuspender el pellet en RPMI suplementado con 10% de LPRP con una concentración 50.000 células/ml. Para ayudar a mantener la humedad del cultivo, se agrega a los pozos laterales 200 µl de RPMI sin suplementar.
- 3 Modelo del Ensayo en Anexo F.
- 4 Ya cultivadas todas las células, se sellan con cinta de enmascarar sobre todo alrededor de la placa para permitir el intercambio de CO₂.
- 5 Llevar a incubar a 37°C a 5% de CO₂ durante 5 días.
- 6 Después de los 5 días de cultivo se agrega 10% de reactivo ALAMAR BLUE y se llevo a incubación nuevamente por 24 horas.

9.2.2.10 Análisis cuantitativo de viabilidad y proliferación celular.

- 1 Al quinto día remover los cultivos de la incubadora, y adicionar a cada pozo el equivalente a 10% de Alamar Blue.
- 2 Incubar por un 4-24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂
- 3 Leer Absorbancias independientes a 540 ó 570 nm y 600 ó 630 nm.

Nota: Los ensayos de linfoproliferación se realizaran empleando células mononucleares (CMNs) de pacientes sanos; y pacientes con SSc.

- Interpretación de resultados por absorbancia:

La absorbancia es directamente proporcional al producto del coeficiente de extinción molar, una par de ecuaciones simultáneas pueden ser obtenidas de dos concentraciones conocidas para determinar:

1. $CRED (\epsilon_{RED}) \lambda_1 + COX (\epsilon_{OX}) \lambda_1 = A \lambda_1$
2. $CRED (\epsilon_{RED}) \lambda_2 + COX (\epsilon_{OX}) \lambda_2 = A \lambda_2$

a) Resolver la concentración de cada componente:

$$CRED = \frac{[(\epsilon_{OX}) \lambda_2 * A \lambda_1] - [(\epsilon_{OX}) A \lambda_1 * A \lambda_2]}{[(\epsilon_{RED}) \lambda_1 * (\epsilon_{OX}) A \lambda_2] - [(\epsilon_{OX}) \lambda_1 (\epsilon_{RED}) \lambda_2]}$$

$$COX = \frac{[(\epsilon_{RED}) \lambda_1 * A \lambda_2] - [(\epsilon_{RED}) \lambda_2 * A \lambda_1]}{[(\epsilon_{RED}) \lambda_1 * (\epsilon_{OX}) \lambda_2] - [(\epsilon_{OX}) \lambda_1 * (\epsilon_{RED}) \lambda_2]}$$

b) Determinar el porcentaje de Reducción:

$$\% \text{ Reducción AB} = \frac{CRED \text{ Pozo a evaluar}}{COX \text{ control negativo}} \times 100$$

$$\% \text{ Reducción AB} = \frac{[(\epsilon_{OX}) \lambda_2 * A \lambda_1] - [(\epsilon_{OX}) A \lambda_1 * A \lambda_2]}{[(\epsilon_{RED}) \lambda_1 * A \lambda_2] - [(\epsilon_{RED}) \lambda_2 * A \lambda_1]} \times 100$$

Donde:

- CRED : Concentración de la forma reducida (rojo)
- COX: Concentración de la forma oxidada (azul)
- ϵ_{OX} : Coeficiente de extinción molar de la forma oxidada
- ϵ_{RED} : Coeficiente de extinción molar de la forma reducida
- A: Absorbancia del Pozo Test
- A': Absorbancia del control negativo. Este puede contener medio + Alamar Blue, pero no células
- λ_1 : 540nm
- λ_2 : 630nm

Nota: Coeficiente de Extinción es constante. A 540 nm el ϵ_{OX} : 47,619 y el ϵ_{RED} : 104,395.

A 630 nm el ϵ_{OX} : 34,798 y el ϵ_{RED} : 5,494.

10 RESULTADOS

PACIENTES

Un total de 26 pacientes colombianos con Esclerosis sistémica (SSc) fueron incluidos en el estudio desde Marzo de 2008 a Diciembre de 2008. En la Primera fase, se realizaron los siguientes exámenes: Tipificación de HLA por biología molecular para los alelos HLA A, B y DR; en esta fase se compararon solo 22/26 pacientes con SSc por ser originarios en tres generaciones de la región del altiplano cundí-boyacense; estos 22 pacientes con SSc fueron comparados con 90 controles provenientes de programa de trasplante, originarios de la misma región y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes para identificar la asociación existente entre Escleroderma y HLA. En la segunda fase se procesaron y analizaron los resultados de frecuencia de ANAS, ENAS, Scl-70, ACAS y APL y se correlacionaron con el HLA del paciente. En la Tercera Fase se realizaron Cultivos de Blastogénesis de 22 pacientes (individuos respondedores) que fueron cocultivados con fitohemaglutinina y células mononucleares de individuos utilizados como estimuladores (diferente HLA clase II del individuo respondedor); para observar el efecto de inhibición de la proliferación se cocultivaron en los dos casos con células mesenquimales a diferentes concentraciones.

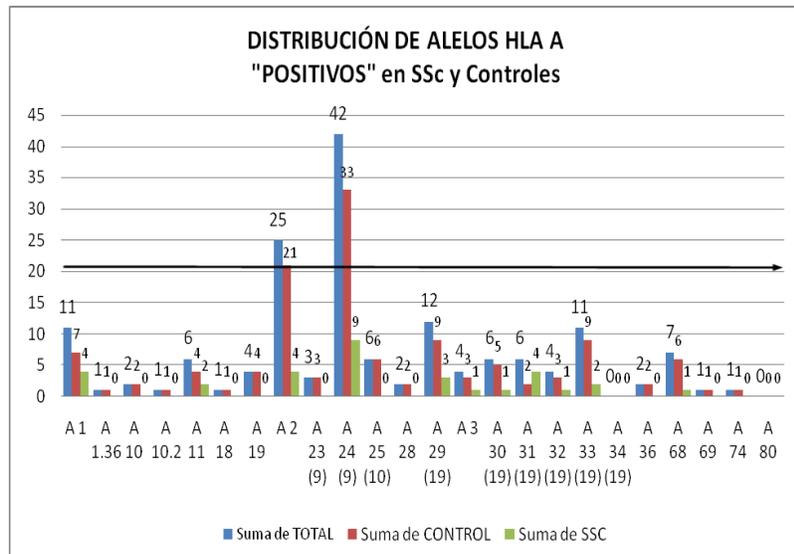
ASOCIACION DEL HLA Y ESCLEROSIS SISTEMICA

HLA (*loci A*, B* y DR**)

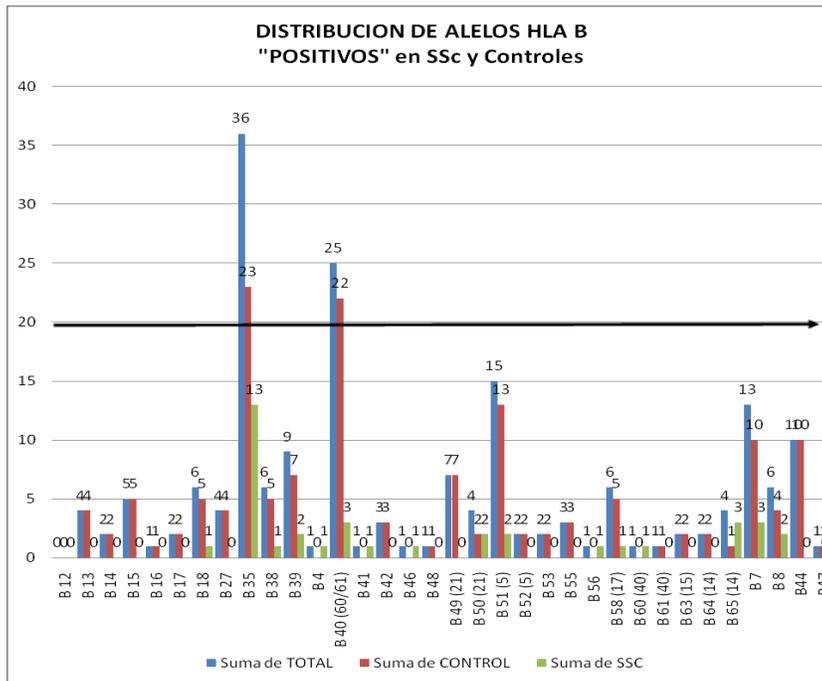
Los datos recogidos de la población estudiada fueron analizados con el programa Estadístico SPSS 17.0. En total se encontraron 68 alelos para HLA estratificados de la siguiente manera; para el locus A* se observaron 23 alelos, para el locus B* se observaron 31 alelos y para el locus DR* se observaron 14 alelos (Anexo B, tablas 1^a, 1b y 1c).

Al analizar los resultados para HLA-A; 4 /22 pacientes SSc fueron positivos para el alelo HLA-A31 con una frecuencia de 18.18%, al compararlos con los controles, 2 /90 fueron positivos (2.22%), se halló asociación estadísticamente significativa entre HLA-A31 y Escleroderma [$pF=0.013^*$, $pMontecarlo=0.018$ (0.282); $p < 0.05$] (Anexo B, tablas 1a y 2a). Igualmente se observa alta frecuencia en los alelos HLA-A2 y A24 con un 18.18%(n=22; 4 casos) y 40.09% (n=22; 9 casos) en SSc, y un 18.75% (n=90; 21 casos) y 33.66% (n=90; 33 casos) en controles respectivamente. (Grafico.1)

Grafico 1. Distribución en Barras de HLA-A positivos en Pacientes SSc y Controles. En el grafico 1 se halla representada la frecuencia observada en cada uno de los alelos HLA-A. En el grafico se observa elevada frecuencia en los alelos HLA-A2 v A24



Al analizar los resultados para HLA-B; 13/22 pacientes SSc fueron positivos para el alelo HLA-B35 presentando un frecuencia de 50.09%, al comparar con los controles 23/90 fueron positivos (25.55%) hallándose asociación estadísticamente significativa entre HLA-B35 y Escleroderma [$p\chi^2 = 0.003$, $pF = 0.004^*$, $pMontecarlo = 0.009$ (0.285); $p < 0.05$] (Anexo B, Tabla 1b y 2.b). A su vez se observa elevada frecuencia del alelo HLA-B35 y B40 tanto en pacientes SSc como en controles; la distribución del alelo HLA-B 40 es 3/22 pacientes SSc (13.63%) y 22/90 controles (24.44%). (Grafico.2)



Grafica.2 Distribución en Barras de HLA-B positivos en Pacientes SSc y Controles. En el grafico 2 se representa la frecuencia observada para cada uno de los alelos HLA-B. En el grafico se puede observar la elevada frecuencia de expresión de los alelos HLA-B35 y HLA-B40.

Al analizar los resultados del locus HLA-DR; 8/22 pacientes SSc fueron positivos para el alelo HLA-DR11 con una frecuencia de 36.36% al compararse con los controles 11/90 (12.22%), se halló asociación estadísticamente significativa entre HLA-DR11 y Escleroderma [$pF=0.025^*$ (0.239); $p < 0.05$], de igual forma se halló asociación estadísticamente significativa entre HLA-DR11 y Ausencia de Escleroderma, debido a que 0/22 (0%) pacientes SSc y 16/90 (17.77%) fueron positivos para el alelo HLA-DR14 [0.022^* (-0.209); $p < 0.05$] (Tabla 1c y 2.c). Se observó alta frecuencia del alelo HLA-DR4 con una frecuencia de 40.9% y 41.11% en pacientes SSc y controles respectivamente.

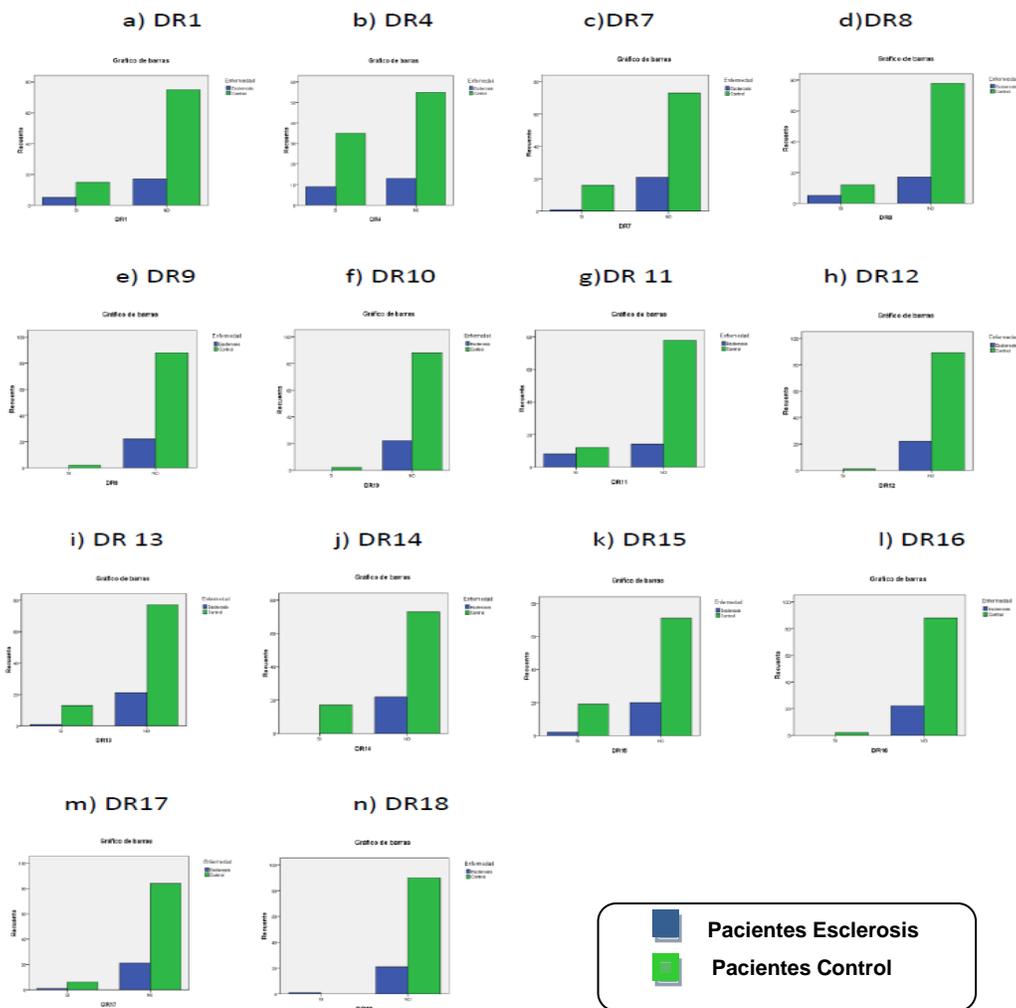


Gráfico 3. Distribución en Barras HLA DR. Cada uno de los alelos HLA-DR están graficados de forma independiente de la siguiente manera; las dos barras de la izquierda representa la expresión del alelo, en cambio las dos barras de la derecha expresan la ausencia de expresión del alelo. El gráfico 3.b muestra la elevada frecuencia de expresión del alelo HLA-DR*4; el gráfico 3.g muestra la asociación existente entre Escleroderma Sistémica y Expresión del alelo HLA-DR*11. El gráfico 3.j muestra el posible efecto protector del HLA-DR 14 hacia la enfermedad ya que solo se halló expresión en los controles 100% (16 casos).

EXAMENES LABORATORIO

Los exámenes de laboratorio realizados fueron ENAS (RO, LA, RNP, Sm), ScI70, ACAS, APL y ANAS. Para el examen ENAS se contó con un total de 26 datos, para ScI70 con 24 datos, para ACAS con 23 datos, para APL con 15 datos y para ANAS con un total de 25 datos. Los datos perdidos se presentaron por falta de muestras y órdenes médicas.

La Media (X) y Mediana (Med) encontrada para cada una de las pruebas realizadas por el Método cuantitativo ELISA, dan negatividad grupal para las mismas, con excepción de ENAS-RO la cual alcanza el límite inferior de positividad de la prueba (Gráfico 4). Los datos encontrados fueron ENAS RO ($X= 9.9865$; $Med=1.55$ UI), LA ($X= 0.8769$; $Med= 0.7$), RNP ($X= 8.55$; $Med= 2.3$), Sm ($X= 2.616$; $Med= 1.5$), ScI70 ($X= 7.775$; $Med= 2.75$), ACAS IgM ($X= 12.5174$; $Med= 8.7$), ACAS IgG ($X= 10.9217$; $Med= 9.5$), APL IgM ($X= 1.85$; $Med= 0.8$) y APL IgG ($X= 2.42$; $Med= 1.6$). (Anexo C; Tabla 3.a).

Tomando los valores resultantes en cada una de las ELISAS de forma cualitativa (Positivo/Negativo) se aprecia una positividad de 19.3% (5 casos) para ENAS-RO, 16.7% (4 casos) para ScI-70 y un 13% (3 casos) para ACAS IgM; el examen APL presentó un 100% de negatividad (Anexo C; Tabla 3.b). A su vez el examen ANAS presentó un 88% (22 casos) de positividad, el patrón con mayor significancia encontrada fue Patrón centrómero con un 43.25% ($n_{ANAS}=32$), seguido del Patrón Moteado Grueso ($n_{ANAS}=32$, 15.64) y Patrón Moteado Fino ($n_{ANAS}=32$, 12.51%) (Gráfico 5).

HLA PACIENTES SSc y EXAMENES DE LABORATORIO

Los datos recogidos de pacientes con SSc ($n_{SSc}=22$) estudiados; fueron analizados con el programa Estadístico SPSS 17.0. En total se encontraron 37 alelos para HLA estratificados de la siguiente manera; para el locus A* se observaron 12 alelos, para el locus B* se observaron 16 alelos y para el locus DR* se observaron 9 alelos; para cada uno de los locus se calculó la asociación entre positividad de las pruebas ANAS, ENAS (RO, LA, RNP, Sm), ScI70, ACAS, APL y la presencia génica de cada uno de los alelos encontrados.

Al analizar los datos del locus A se halló asociación estadísticamente significativa entre HLA-A26 (10) y prueba ENAS-Sm positiva (+) [$p-F= 0.045^*$; $p < 0.05$]; al analizar el locus B se halló asociación estadísticamente significativa entre HLA-B50 y prueba ACAS IgM positiva

(+) [p -F= 0.016*; $p < 0.05$]; con respecto al locus DR no se halló ningún tipo de asociación (Anexo D; Tabla 4^a, 4b y 4c).

CULTIVO CELULAR MSC

Las MSCs de medula ósea fueron obtenidas a partir de 9 donadores voluntarios; 8 donadores no poseían antecedentes clínicos hematológicos ni inmunológicos (Donadores sanos); un (1) donador poseía SSc. Las MSCs aisladas y cultivadas en DMEM-LG suplementado con LPRP 10% + 1% de antibióticos, fueron expandidas hasta el 6°- 7° pase con el fin de homogeneizar la población celular y obtener líneas celulares de cultivo primario de MSC. Las líneas celulares de MSCs fueron congeladas en solución criopreservante a una concentración de 1×10^6 cél/ml hasta el momento de su utilización.

Las líneas celulares MSCs descongeladas y cultivadas, llevadas a irradiación (30Gy) mostraron una viabilidad celular de 90% en el momento de ser agregadas a la microplaca de 96 pozos. Protocolo de irradiación previamente estandarizado en el Banco de Células Stem de Colombia (*Estandarización de Técnica de irradiación celular utilizando dos modelos: El modelo de cultivo primario y Ensayo de blastogénesis de linfocitos*).

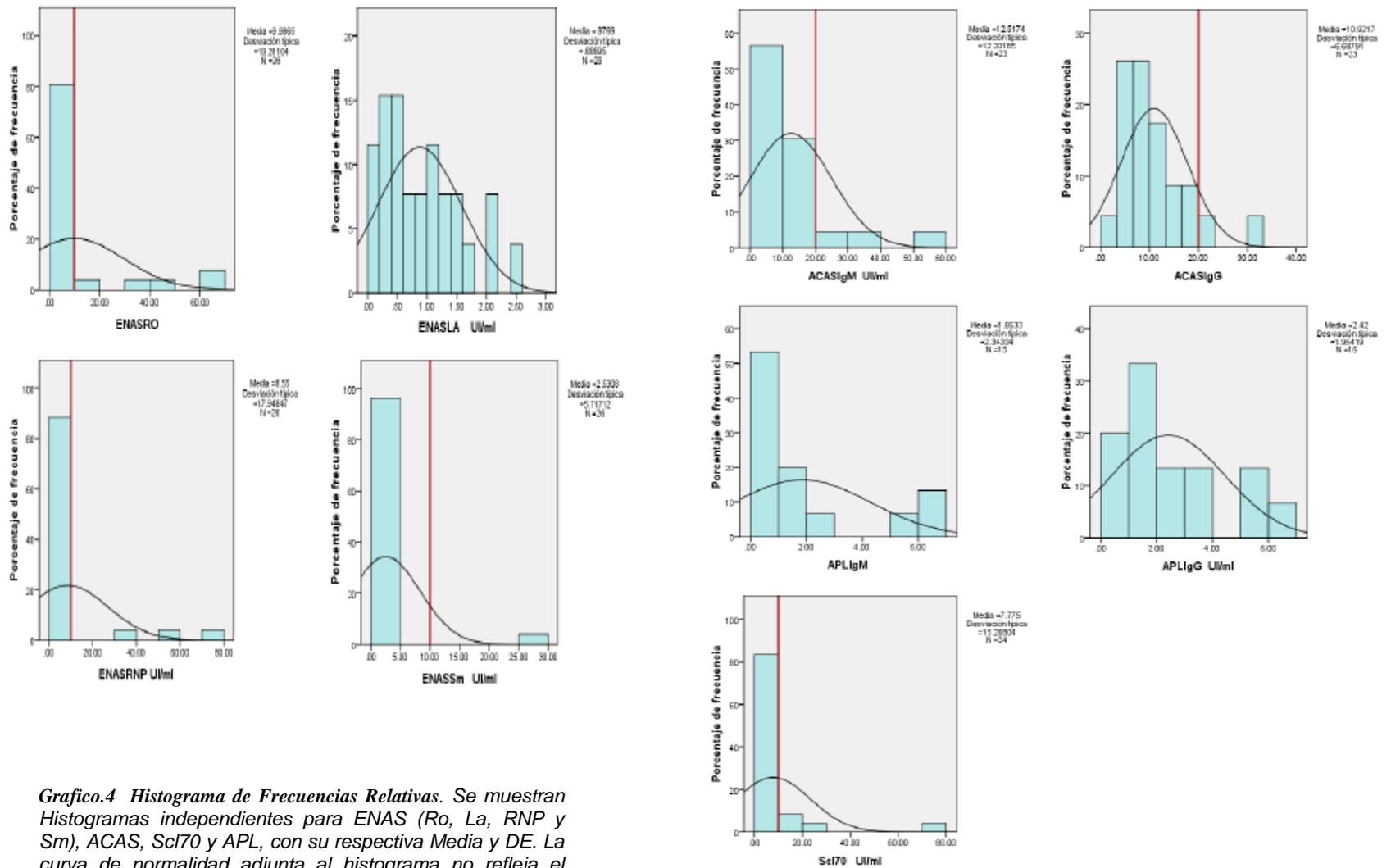
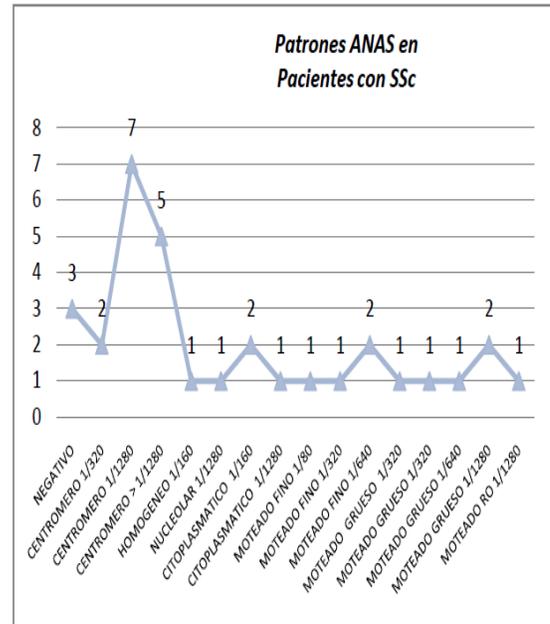


Grafico.4 Histograma de Frecuencias Relativas. Se muestran Histogramas independientes para ENAS (Ro, La, RNP y Sm), ACAS, Sci70 y APL, con su respectiva Media y DE. La curva de normalidad adjunta al histograma no refleja el comportamiento de los datos, es empleada estrictamente para ubicar visualmente la media encontrada para cada una de las pruebas. La línea Roja en el eje "Y" representa al lado Izquierdo= Negatividad y Derecho= Positividad de la prueba.

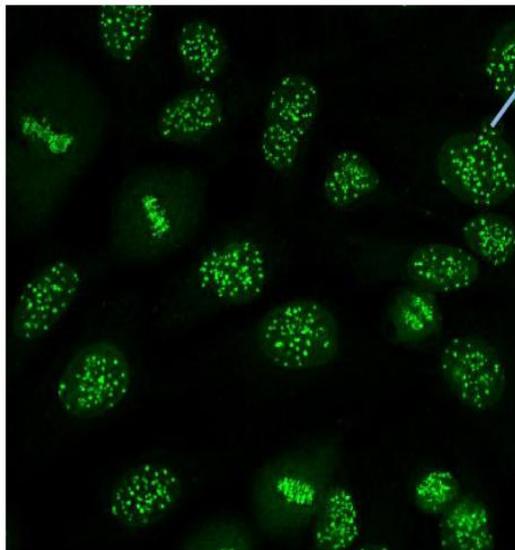
a)

ANAS		
NEGATIVO	3	9.37 %
CENTROMERO 1/320	2	6.25 %
CENTROMERO 1/1280	7	21.88 %
CENTROMERO > 1/1280	5	15.6 %
HOMOGENEO 1/160	1	3.13 %
NUCLEOLAR 1/1280	1	3.13 %
CITOPLASMATICO 1/160	2	6.25 %
CITOPLASMATICO 1/1280	1	3.13 %
MOTEADO FINO 1/80	1	3.13 %
MOTEADO FINO 1/320	1	3.13 %
MOTEADO FINO 1/640	2	6.25 %
MOTEADO GRUESO 1/320	1	3.13 %
MOTEADO GRUESO 1/320	1	3.13 %
MOTEADO GRUESO 1/640	1	3.13 %
MOTEADO GRUESO 1/1280	2	6.25 %
MOTEADO RO 1/1280	1	3.13 %

b)



c)



PATRON CENTROMERO

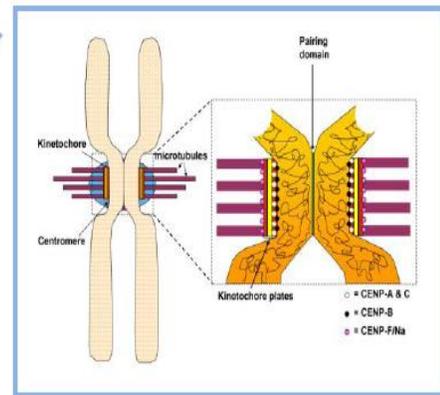


Grafico 5. Resultados ANAS. El grafico 6.a Frecuencia Relativa encontrada en los diversos patrones positivos para ANAS. Grafico 6.b Polígono de Frecuencias para ANAS. Grafico 6.c Representación ANAS Positivo - Patrón Centrómero. Tomado de "Atlas of HEp-2 patterns; Thrid Edition, pág. 63)

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE MSCs DERIVADAS DE MEDULA OSEA

La caracterización fenotípica de los marcadores de superficie CD105, CD73, HLA DR, CD34/45, CD 133 y CD14, fue realizada al 7° pase de cultivo. Los datos se corrieron por el programa Cell Quest Pro, para verificar la coexpresión de proteínas de membrana típicas de MSCs. Hallando positividad de marcadores CD105^{+++high}, CD73⁺ con ausencia de expresión de HLA-DR⁻ y marcadores de linaje hematopoyético CD45⁻ CD133⁻ y CD14⁻ (Tabla 1; Grafico 6).

Tabla.1 Resultados Citometría de Flujo

MARCADOR	CD45	CD133	CD14	CD73	CD105	HLA-DR
POSITIVO	0,89%	1,06%	7,14%	57,14%	100%	4,55%
NEGATIVO	99,11%	98,94%	92,86%	42,86%	0.00%	95.45%%

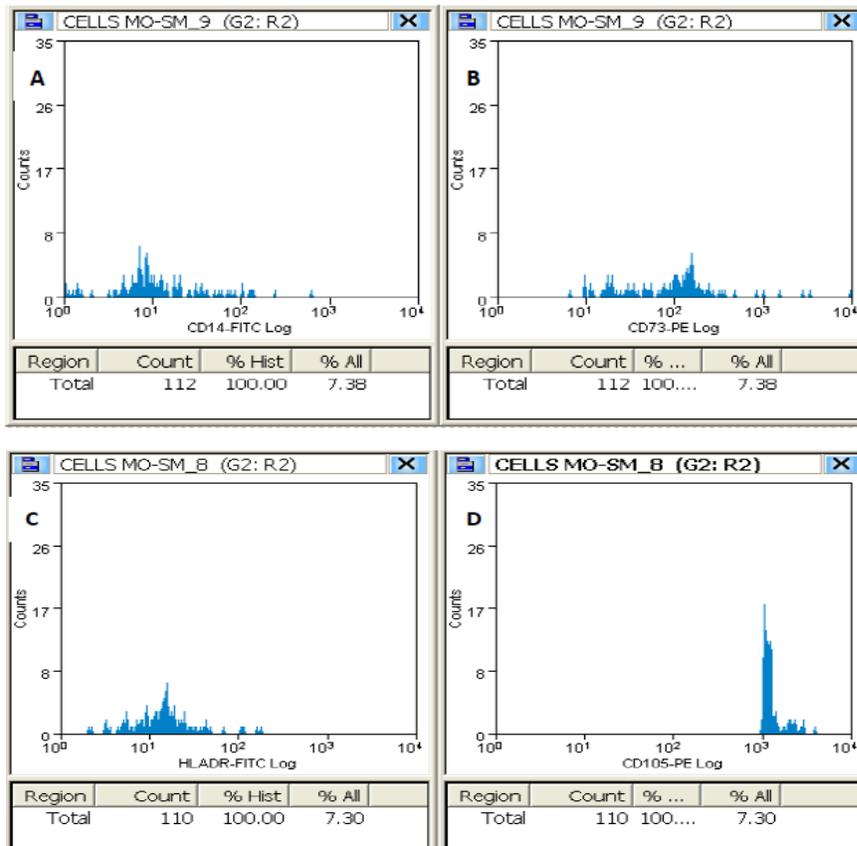


Fig. 6 Continúa....

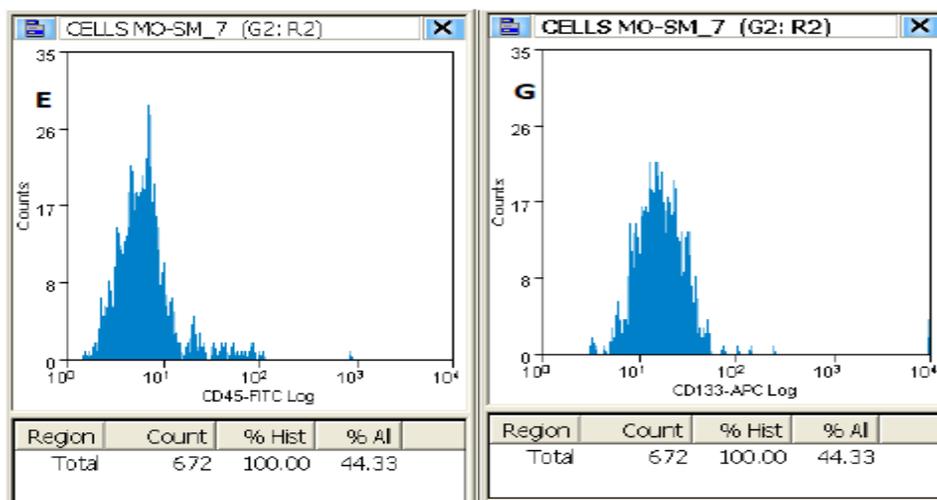


Grafico 6. Citometría de flujo. A) Población CD14, se observa solo 7,14% de CD14+. B) Población CD73, se puede observar como el 57,14% es CD73+. C) Población HLA-DR negativo en un 95.45%. D) Población CD105, se puede observar una población homogénea CD105+ 100% Positiva. E y F) Población CD45 y CD133; como se observa en la grafica solo el 0,89% son CD45+ y el 1,06% son CD133.

ENSAYO DE BLASTOGENESIS Y ALOREACTIVIDAD

Para los ensayos in vitro se cultivaron 20 pacientes con SSc y 2 controles los cuales fueron evaluados frente a la respuesta a mitógenos, para los ensayos de aloreactividad se realizo el cultivo mixto de linfocitos teniendo en cuenta que existieran diferencias del HLA entre las dos poblaciones (estimuladora y respondedora). Los cultivos fueron realizados en presencia y ausencia de MSCs previamente irradiadas (30 Gy) en diluciones 1:1, 1:10 y 1:100, en microplacas de 96 pozos con fondo en U con montaje triplicado. Las MSCs se adicionaron primero con el fin de facilitar la adhesión, al cabo de dos horas a 37°C, se adicionaron las PBMCs en una concentración de 50×10^3 cél/pozo en medio RMPI II 1640 suplementado con 10%SFB. Posteriormente se llevó a incubación a 5% CO₂- 37°C por 5 días.

Al día quinto se adicionó 10% de Alamar Blue en cada uno de los pozos y se llevo a incubar 4 Horas a 5% CO₂- 37°C; debido a que no se encontraron absorbancias significativas para calcular el % de reducción de Alamar Blue e Índice de Proliferación Celular se opto por montar el ensayo de blastogénesis por segunda vez aumentando el tiempo de incubación con el alamar blue a 24 horas, para obtener el porcentaje de reducción. Trascurridas las 24 horas se realizo lectura a 540 y 630 nm y se calculó % de Reducción de AB y concentración celular en cada uno de los ensayos (Tabla 2 y Anexo E).

El mayor índice de inhibición en ambos ensayos se obtuvo al emplear concentración de MSC/CMN, 1:1; observando índices de Inhibición de 1,9 y 1,58 para estimulación con PHA y células alogénicas respectivamente. De igual forma hubo inhibición en la proliferación celular usando la concentración MSC/CMN; 1:10 con índices de inhibición para PHA de 1,26 y para células alogénicas de 1,16). En concentraciones de MSC/CMN, 1:100 no se observa ningún tipo de inhibición (Tabla 3).

Tabla 2. Porcentaje De Reducción Ab y Concentración Celular

ENSAYO	% REDUCCION Alamar Blue (AB)	CONCENTRACION Células/ml
<i>Paciente</i>	48,91	54700
<i>Paciente + Paciente irr</i>	48,04	51500
<i>Paciente + PHA</i>	63,61	150000
<i>Paciente irr + PHA</i>	48,37	53100
<i>Paciente + Paciente irr + PHA</i>	63,48	148700
<i>Paciente + MSC 1:1 + PHA</i>	54,26	78930
<i>Paciente + MSC 1:10 + PHA</i>	60,24	119070
<i>Paciente + MSC 1:100 + PHA</i>	63,92	153200
<i>Paciente + MSC 1:1</i>	48,34	52600
<i>Paciente + MSC 1:10</i>	48,7	53900
<i>Paciente + MSC 1:100</i>	48,99	54980
<i>Paciente + Estimulador</i>	59,09	110000
<i>Estimulador + PHA</i>	48,47	53070
<i>Paciente + MSC 1:1 + Estimulador</i>	52,40	69500
<i>Paciente + MSC 1:10 + Estimulador</i>	56,97	95070
<i>Paciente + MSC 1:100 + Estimulador</i>	59,36	112040

Tabla 3. Índices de Estimulación e Inhibición empleando PHA, Células alogénicas y MSC.

ENSAYO	ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN	INDICE DE INHIBICION
Cultivo Mixto de Linfocitos (CML)		
<i>Paciente + PHA</i>	2,74	1
<i>Paciente + MSC 1:1 + PHA</i>	1,44	1,9
<i>Paciente + MSC 1:10 + PHA</i>	2,17	1,26
<i>Paciente + MSC 1:100 + PHA</i>	2,8	0,98
Ensayo de Blastogénesis		
<i>Paciente + Estimulador</i>	2,01	1
<i>Paciente + MSC 1:1 + Estimulador</i>	1,27	1.58
<i>Paciente + MSC 1:10 + Estimulador</i>	1,73	1.16
<i>Paciente + MSC 1:100 + Estimulador</i>	2,04	0,8998

11 DISCUSION DE RESULTADOS

La frecuencia de los antígenos HLA varían de un grupo humano a otro caracterizándolos como población; las poblaciones mestizas pueden tener variaciones en la frecuencia de los alelos tanto en HLA A, B, como DR de acuerdo a las poblaciones originarias; estas variaciones pueden incidir sobre su susceptibilidad y resistencia a determinadas enfermedades. En enfermedades autoinmunes desde 1974 se reportó la asociación entre HLA Dw4/Artritis reumatoide y HLAB27/Espondilitis anquilosante; en la actualidad sólo el HLA B27 y sus diferentes variantes están asociadas a la espondilitis anquilosante a nivel mundial cruzando todas las barreras raciales entorno al polimorfismo genético multiétnico.

En esclerosis sistémica se han reportado diferencias de comportamiento y aspectos de la enfermedad entre los diferentes grupos étnicos, ya que se han descrito diversas asociaciones demográficas entre alelos HLA y patrones de auto anticuerpos ^(113,184,201); al igual entre respuesta de la enfermedad ante tratamiento y control inadecuado en individuos afroamericanos e hispanos. Por lo tanto, los factores genéticos son importantes en la patogenia y tratamiento de la SSc; aclarando que la predisposición genética por si sola no es fidedigna de presentar la enfermedad, ya que está se halla sujeta a interacciones con factores ambientales desconocidos que desencadenan el proceso de enfermedad, ya que los hallazgos de la variabilidad genética no explican en su totalidad las diferencias clínicas e inmunológicas existentes entre los diferentes grupos étnicos ⁽¹⁵⁹⁾.

En la mayoría de enfermedades asociadas a HLA se han reportado como las asociaciones varían de una población a otra, por lo cual el estudio de pacientes SSc y controles de la misma población nos proveerá resultados mas veraces, debido a que Colombia es un país suramericano compuesto por diversos grupos étnicos (Mestizos, Afrodescendientes, Indígenas).

El Hospital Militar Central es un centro de remisión a nivel nacional de las fuerzas militares situado en el altiplano cundí-boyacense, razón por la cual el 84.26% de los pacientes con SSc eran oriundos de esta zona demográfica, exigiendo hacer selección de controles originarios de esta misma región del país, excluyendo al 15,38% de pacientes SSc en el estudio de asociación HLA/SSc. Después de ajustar los pacientes y controles, por las variables anteriormente citadas; se halló que el polimorfismo y las frecuencias alélicas persistían paralelamente en ambas poblaciones.

HALLAZGOS HLA

Similar a lo reportado por Ossa, colaboradores y Rodríguez, colaboradores (145, 162); se observa elevado polimorfismo de HLA en nuestros pacientes con SSc y controles colombianos provenientes de esta zona del país ya que se observaron 68 alelos HLA distribuidos así; locus A*: 23 alelos, locus B*: 31 alelos y locus DR*: 14 alelos.

Al examinar los resultados de HLA en el locus A* se observó elevada frecuencia en los alelos HLA-A2 y HLA-A24 por parte de controles y pacientes SSc, con un porcentaje acumulado entre A2 y A24 de 52,41% para controles y 59,08% para pacientes SSc. Lo anterior confirma estudios polimórficos previos realizados en población colombiana donde los alelos A2 y A24 representaron frecuencias acumuladas entre 41,3% y 54% de la diversidad alélica de locus A (145, 162). De igual se halló asociación entre la presencia de SSc y el alelo HLA-A31.

En el locus B* se observó elevada frecuencia en los alelos HLA-B35 y HLA-B40 con porcentajes acumulados de 72,72% para pacientes SSc y 50% en controles. Ossa; colaboradores y Rodríguez; colaboradores, encontraron frecuencias significativas similares para B*35, B*44 y B*65 en población colombiana. Por lo tanto; la asociación hallada en nuestro estudio entre SSc, HLA-B35 y HLA-B65 estaría relacionada principalmente con polimorfismo alélico característico de la población colombiana y no con la enfermedad. Con base en lo anterior, sería interesante realizar tipificación de HLA por alta resolución para ver el alelo particular B35 y así analizar si este es similar o difiere entre pacientes SSc e individuos sanos.

En nuestro estudio es confirmada la fuerte asociación existente entre HLA-DR11 y la presencia de SSc en población Colombiana proveniente del altiplano Cundí-boyacense. Similar a lo reportado por otros autores, estudios previos realizados en pacientes Americanos y Europeos Caucásicos y Afroamericanos con SSc han hallado asociación de la enfermedad con el haplotipo HLA-DRB1*11, coexpresión de HLA-DR5/DR11, HLA-DR1, HLA-DQB1*03_(3,27), HLA-DQA2 [Producto del desequilibrio de asociación entre DR3/DR11] y la combinación de haplotipos HLA-DR3/DRw5_(16,28,29). De igual forma, Reveilli y colaboradores reportaron asociación entre DR4/DR11 y SSc en población hispana radicada en USA₍₁₅₉₎. Un estudio realizado en México, analizó los antígenos de clases I, II y III del complejo principal de histocompatibilidad en 41 pacientes mestizos mexicanos con SSc, 113 familiares de primer grado y 85 controles; hallando que el HLA DR5 (DRB1*1104) confiere

susceptibilidad a SSc asociado con las formas difusas y limitadas de la enfermedad y no con el síndrome de CREST ⁽²⁰⁰⁾. Panayiotis y colaboradores; reportaron alta frecuencia de los alelos DRB1*1101 y DRB1*1104 en población griega con SSc, hallando asociación significativa entre SSc y HLA-DRB1*1104 en pacientes con la forma difusa de la enfermedad con desarrollo de anticuerpos anti-topo I ⁽¹⁴⁷⁾.

Adicionalmente, en nuestro estudio se halló asociación entre HLA-DR14 y ausencia de la enfermedad; por lo cual nos planteamos la siguiente pregunta ¿El Haplotipo HLA-DR14 puede tener un efecto protector hacia la enfermedad (SSc)?

HLA EN SSc y LABORATORIOS

La frecuencia de auto anticuerpos en nuestro estudio fue de 17.31%, donde la presencia de ANAS, ENAS-RO, Scl-70 y ACAS IgM presentaron mayor prevalencia con un porcentaje de positividad de 88%, 19.2%, 16,7% y 13% respectivamente. El 88% de pacientes ANAS positivo (+), el 43.75% eran positivos para Patrón Centrómico; confirmando estudios previos donde los principales marcadores diagnósticos de SSc son anticuerpos anti-centrómico y anti-topoisomerasa I. Al analizar la asociación entre HLA de pacientes SSc y presencia de auto anticuerpos hallamos asociación de el haplotipo HLA-A26 (10) con la presencia de ENAS-Sm positivos (+) y HLA-B50 con ACAS IgM positivos (+).

ENSAYO DE BLASTOGENESIS

Similar a lo reportado por Bocelly-Tyndal, este estudio demostró en población colombiana del altiplano cundí-boyacense la inhibición de la proliferación en ensayo in Vitro de linfocitos de pacientes con esclerosis sistémica cocultivados con MSCs expandidas in vitro provenientes de controles y pacientes con SSc; de manera alterna también se demostró que las células MSC de un paciente con SSc disminuyeron la proliferación de linfocitos tanto de pacientes como de controles. No evidenciándose diferencias significativas en el tipo de célula mesenquimal.

Las células mesenquimales cocultivadas en una proporción de 1:100 con las CMN no inhiben la proliferación del cultivo, en el caso de la dilución 1:10 se observa un efecto menor de inhibición que el obtenido en la dilución 1:1 ver tabla. La PHA indujo como era de esperarse estimulación linfocitaria en la mayoría de los casos adicionalmente, se observó que todas las MSCs tanto de controles como SSc no estimulaban la proliferación de CMN al

momento de ser añadidas en la placa de cultivo, ya que no poseen HLA-DR.

En el cultivo Mixto de Linfocitos (MLC) la MSC disminuyó la proliferación de CMN, confirmando estudios previos realizados por otros autores ^(118,120,156,196), un máximo de inhibición proliferativa se observó en el cocultivo con una proporción 1:1 de MSC/CMN, de igual forma también se observó reducción en la proliferación celular en proporción 1:10.

Similar a lo reportado, éste estudio demuestra *In vitro* el papel inmunomodulador de las MSCs derivadas de medula ósea de donadores sanos o con enfermedades autoinmunes cultivadas y expandidas; de igual modo se necesita estudiar en modelos *In vitro* diluciones que utilicen una concentración de 1:1 a 1:10 de MSC y CMN debido a que alcanzar concentraciones de MSC similares al número de CMN presentes en un individuo no resulta viable no solo por los costos y fuente de obtención de MSCs si no por que podría aumentar el riesgo de desequilibrar al paciente.

Aunque no está dilucidada la concentración fisiológica de MSC que permitiría su utilización *in vivo* es necesario evaluar modelos acerca del comportamiento *in vivo* de la MSC; estudios realizados en pacientes con enfermedad de injerto versus huésped (GVHD) han evidenciado el potencial clínico e inmunomodulador de la MSC. Por lo tanto al ampliar los conocimientos implicados en la migración de la MSC al tejido requerido y los mecanismos inductores *in situ* del efecto antiproliferativo ejercido por la MSC, conllevaría a instaurar la MSC como una nueva terapia celular.

11. CONCLUSIONES

1. La población Colombiana proveniente del altiplano Cundí-boyacense posee gran polimorfismo alélico para los loci A, B y DR.
2. Los Alelos HLA-A2, A24, B65, B35 y DR4 son alelos característicos de la población colombiana.
3. Existe Asociación entre el alelo HLA-DR 11 y SSc en pacientes Colombianos provenientes del altiplano Cundí-boyacense.
4. El alelo HLA-DR14 puede tener un posible efecto protector hacia la enfermedad.
5. La presencia de Auto anticuerpos ENAS Sm y ACAS IgM en pacientes con SSc provenientes del altiplano Cundí-boyacense están asociados con los alelos A-26 y B-50; respectivamente.
6. Existe inhibición de la proliferación de los linfocitos T de pacientes SSc cocultivados con Células Stem Mesenquimales provenientes tanto de individuos sanos como de pacientes con SSc.
7. Concentraciones celulares entre 1:1 y 1:10 de MSC/CMN logran inmunomodulación efectiva de linfocitos in vitro.

12. RECOMENDACIONES

1. Ampliar la población estudio de forma bidireccional con el fin de rectificar la asociación hallada entre HLA-DR 11 y Esclerosis sistémica en pacientes provenientes del altiplano Cundí-boyacense. Así como la asociación entre HLA-DR14 y ausencia de la enfermedad.
2. Realizar estudios en otras poblaciones y regiones del país empleando pacientes SSc y controles sanos de la misma región; con el fin de apreciar si la asociación encontrada entre DR11 y SSc es persistente en toda la población colombiana o se atribuye exclusivamente a individuos provenientes del altiplano Cundí-boyacense.
3. Se sugiere subtipificar los diversos alelos particulares de HLA-B35 por PCR de alta resolución de pacientes SSc y controles, con el fin de evaluar posibles diferencias alélicas dentro del alelo B35 debido a su elevado polimorfismo. De igual forma se buscaría identificar alelos particulares propios de la población Colombiana.

BIBLIOGRAFIA

1. ABDALLAH AM, Renzoni EA, Anevlaivis S, Lagan AL, Munkonge FM, Fonseca C, et al. A polymorphism in the promoter region of the CD86. (B7.2) gene is associated with systemic sclerosis. *Intg J Immunogenet* 2006; 33:155-61.
2. ABKOWITZ, J. Can Hematopoietic Stem Cells Become Skin, Gut, or Liver Cells? *The New England Journal of Medicine* 2002; 346:770-772.
3. ADORNO D, Piancatelli D, Canossi A, Aureli A, Di Rocco M, Papola F. HLA-DPB1, -DQA1, -DQB1 and -DRB1 alleles in a population from Central Italy. *Hum Immunol* 2004;65:980-1.
4. AFIL S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9:702-12.
5. AGARWAL Sandeep K, Filemon K. Tan and Frank C. Arnett . Genetics and genomic studies In scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin N Am* 34 ;2008 p:17-40
6. AGGARWAL S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
7. A. GRATHWOL, J. passwed, I. gerber, A. tyndall. Stem cell transplatation in autoimmune disease. *Best practice & research Clinical haematology*. 2001; Vol. 14, N° 4; 755-776.J
8. AHUJA SS, Paliogianni F, Yarnada H, Balow JE, Boumpas DT. Effect of transforming growth factor- β on early and late activation events in human T cells. *J Immunol* 1993; 150: 3109.
9. AKASAKI Y, Liu G, Chung NH, Ehtesham M, Black KL, Yu JS. Induction of a CD4+T regulatory type 1 response by cyclooxygenase- 2-overexpressing glioma. *J Immunol* 2004; 173: 4352-9.
10. ALLANORE Y, Wipff J, Kahan A, Boileau C. Rev: Genetic basis for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 577-583.

11. ALMASI S, Erfani N, Mojtahedi Z, Rajaei A, Ghaderi A. Association of CTLA-4 gene promoter polymorphisms with systemic sclerosis in Iranian population. *Genes Immun* 2006; 7: 401-6.
12. ANGOULVANT D, Clerc A, Benchalal S et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology* 2004; 41: 469–76.
13. ARIKAWA T, Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004; 200: 400–6.
14. ARNETT FC, Howard RF, Tan F, et al: Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1362–70.
15. ARNETT CM. Immunology of systemic sclerosis. *Frontiers in Bioscience* 2005; 10: 1707–1719.
16. ARNETT FC. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol* 1995;12(2–4):107–28.
17. ASSASSI S, MayesMD,McNearneyT, Fischbach M, Reveille JD, Arnett FC, et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin converting enzyme in systemic sclerosis. *Am J Med* 2005; 118: 907-11.
18. ASTIS trial ; www.astistrial.com
19. ATAMAS SP, White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 537-50.
20. ATAMAS SP, Luzina IG, Dai H, Wilt SG, White B. Synergy between CD40 ligation and IL-4 on fibroblast proliferation involves IL-4 receptor signaling. *J Immunol* 2002; 168: 1139-45.

21. ATAMAS SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* 2002;72:631-43.
22. AUGELLO A, Tasso R, Negrini SM et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1482–90.
23. AVILA L M. Romero C, Manual practico de Inmunología Clínica. Santafe de Bogotá, Colombia. Primera Edición 253 p.
24. BARBARIN V, Arras M, Misson P, Delos M, McGarry B, Phan SH, et al. Characterization of the effect of interleukin-10 on silica induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:78-85.
25. BARTHOLOMEW A, Sturgeon C, Siatskas M et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42–8.
26. BEYTH S, Borovsky Z, Mevorach D et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214–9.
27. BOEHM U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-95
28. BRIGGS DC, Vaugham RW, Welsh KI, Myers A, du Bois RM, Black CM. Immunogenetic prediction of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Lancet* 1991;338:661–2.
29. BRIGGS D, Stephen C, Vaugham R, Welsh K, Black C. A molecular and serologic analysis of the major histocompatibility complex and complement component C4 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1993;36:943–54.
30. BROUTY-BOYÉ D, Pottin-Clémenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 2000; 30: 914-9.
31. BROWN RR, Fissette PL, Ared RA, Ozaki Y. Tryptophan metabolism and immune

markers in eosinophilia-myalgia syndrome associated with tryptophan ingestion. *Advances in Tryptophan Research* 1992; 337-346.

32. BROWN RR, Lee CM, Kohler PC, Hank JA, Storer BE, Sondel PM. Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin - 2. *Cancer Res* 1989; 49: 4941 – 4944.
33. BROWN RR, Ozaki Y, Datta SP, Borden EC, Sondel PM, Malone DG. Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, auto-immune disease and AIDS. *Adv Exp Med Biol* 1991; 294: 425 – 435.
34. BROWN RR. Tryptophan metabolism: A review. En: Kochen W, Steinhart H. *L-Tryptophan Current Prospects in Medicine and Drug Safety*. New York: Warter de Gruyter, 1994; 17-30
35. BUHRING et al, 1999; Fukao et al, 1999; Kenan et al, 1992, Kawashima 1998 et al; Kunikata et al, 1998; Ohbo et al, 1995; Ryan, Vadas & Shannon, 1994.
36. BUHRING, H. J., Simons, P. J., Pudney, M., Muller, R., Jarrossay, D. & van Agthoven, A. (1999) The monoclonal antibody 97 A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*, 94, 2343-56.
37. BURT RK, Marmont A, Oyama Y, et al. Randomized controlled trials of autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. The evolution from myeloablative to lymphoablative transplant regimens. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3750
38. CHAN JL, Tang KC, Patel AP et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . *Blood* 2006; 107:4817–24.
39. CHARLES CHRISTINA, Philip Clements, Daniel E Furst. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies *Lancet* 2006; 367: 1683–91.
40. CONGET PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 67–73.

41. CORCIONE A, Benvenuto F, Ferretti E et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107: 367–72.
42. D FARGE, J Passweg, J M van Laar, Z Marjanovic, C Besenthal. Et al Autologous stem cell transplantation in the treatment of systemic sclerosis: report from the EBMT/EULAR Registry. *Ann Rheum Dis* 2004;63; 974-981.
43. DARWIN J. PROCKOP Marrow stromal cells as stem cells for continual renewal of nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene terapia *Journal of Cellular Biochemistry*. Volume 72, Issue S30-31 , Pages 284 – 285.
44. DE UGARTE DA, Alfonso Z, Zuk PA et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multilineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; 89: 267–70.
45. DEANS RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875–84.
46. DENNIS JE, Carillet JP, Caplan AI, Charbord P. 2002. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*, 170:73-82.
47. DI NICOLA M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99:3838-3843.
48. DJOUAD F, Pience P, BonyCet al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003: 102: 3837–44.
49. DOUCET C, Brouty-Boyé D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increpase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol* 1998; 10: 1421-33.
50. DUNCAN MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult termal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J*

Invest Dermatol 1991;97(4):686-92.

51. EDWARDS B. Stem cells today: A. origin and Potential of embryo stem cells. Reproductive BioMedicine on line. 2004; 8(5) 275 - 306.
52. ENGLERT H, Small-McMahon J, Davis K, O'Connor H, Chambers P, Brooks P: Male systemic sclerosis and occupational silica exposure– a population-based study. *Aust N Z J Med* 2000;30:215–20
53. ENGLISH, Karen., Barry, Frank P., Field-Corbett, Ciara P., Mahona, Bernard P. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. 2007, En línea.
54. F. O. GUEVARA PULIDO, Mario Enrique Díaz Cortés. Escleroderma. *Acta Med Colomb* 2006; 32: 83-91.
55. FATINI C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Angotti C, Conforti ML, et al. High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis. *Am J Med* 2002; 112: 539-43.
56. FINN G.. Histología sobre bases moleculares. 3 edición 2000. Bogotá, Colombia. Editorial. Panamericana.
57. FLAVIO albarracin, maria jose lopez meier, gustavo naswetter, hector longoni. trasplante de celulas progenitoras hematopoyeticas en enfermedades autoinmunes medicina (buenos aires) 2008; 68: 153-163.
58. FONSECA C, Renzoni E, Sestini P, Pantelidis P, Lagan A, Bunn C, et al. Endothelin axis polymorphisms in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006;54:3034-42.
59. FRAZIER K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 404-11.
60. FUCHS E, Segre J. Stem cell: a new lease on life. *Cell*. 2000;(100): 143-155.

61. FUJIGAKI S, Saito K, Sekikawa K, et al. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3 dioxigenase is mediated dominantly by an IFN-g independent mechanism. *Eur J Immunol* 2000; 31:2313-2318.
62. FUKAO, T., Kaneko, H., Berrell, G., Gatei, M., Tashita, H. & Yoshida, T. (1999). ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 94, 1998-2006.
63. GALIE N, Manes A, Farahani KV, Pelino F, Palazzini M, Negro L, et al. Pulmonary arterial hypertension associated to connective tissue diseases. *Lupus* 2005;14:713-7.
64. GARCÍA López Alicia, Espigado T.I, Cid Boza. Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos en Enfermedades Autoinmunitarias Sistémicas. Situación Actual. *Reumatología Clínica* 2006. Vol. 2. Núm. 3. Pag. 146-151.
65. GHARAE-KERMANI M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *The journal of biological chemistry* (1996). Vol. 271, No. 30, Issue of July 26, pp. 17779–17784.
66. GHARAE-KERMANI M, Phan SH. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. *Curr Pharm Des* 2001; 7:1083-103.
67. GILCHRIST FC, Bunn C, Foley PJ, Lympny PA, Black CM, Welsh KI, et al. Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun* 2001; 2:76-81.
68. GLENNIE S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821–7.
69. GOURH P, Tan FK, Assassi S, Ahn CW, McNearney TA, Fischbach M, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with antitopoisomerase-I and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3945-53.

70. GRANEL B, Allanore Y, Chevillard C, Arnaud V, Marquet S, Weiller PJ, et al. IL13RA2 gene polymorphisms are associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006;33: 2015-9.
71. GRANEL B, Chevillard C, Allanore Y, Arnaud V, Cabantous S, Marquet S, et al. Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics* 2006; 58:693-9.
72. GRANT MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Names RN, et al. Adult Hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607
73. GROH ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 928–34.
74. HAMELRYCK, T. W., Dao-Thi, M.H., Poormans, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L. & Loris R. (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem*, 271, 20479-85.
75. HASEGAWA MINORU, Fujimoto Manabu, Takehara Kazuhiko, Sato Shinichi. Pathogenesis of systemic sclerosis: Altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *Journal of Dermatological Science* (2005) 39, 1-7.
76. HASEGAWA M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP- y MIP-1 α) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:159-65.
77. HERRICK AL, Worthington J. Genetic epidemiology in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2002;4: 165–8.
78. HIBI M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1996; 74:1-12.

79. HOLCOMBE RF, Baethge BA, Wolf RE, Betzing KW, Stewart RM. Natural killer cells and T-cells in scleroderma: relationship to disease duration and anti-Scl-70 antibodies. *Ann Rheum Dis* 1995;54:69-72.
80. HU PQ, Fertig N, Medsger Jr. TA et al. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 2003; 48(5): 1363–1373.
81. HUDSON LL, Rocca KM, Kuwana M, Pandey JP. Interleukin-10 genotypes are associated with systemic sclerosis and influence disease-associated autoimmune responses. *Genes Immun* 2005;6:274-8
82. HUFFSTUTTER JE, DeLustro FA, LeRoy EC. Cellular immunity to collagen and laminin in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1985;28(7):775-80.
83. HUSSEIN MR, Hassan HI, Hofny ER, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AE, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells. CD4/CD8 T-cells, interleukin 1 and tumour necrosis factor- α in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol* 2005; 58:178-84.
84. HWU P, Du M, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young H. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000; 164:3596 – 3599
85. IHN H, Yazawa N, Kubo M et al. Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with localized scleroderma and correlated with serological and clinical features of the disease. *The Journal of Rheumatology* 2000; 27(3): 698–702.
86. IHN H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheum* 2002; 14: 681–85.
87. IHN H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulation of collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of TGF-beta receptors. *Arthritis Rheum* 2004; 44: 474–80.

88. Henningson C, Stanislaus M, and Gewirtz A. Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003;111:S745-53
89. J. STAGG Review: Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin *Journal compilation* 2006 :69 (1–9).
90. JELASKA A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2230-9.
91. JERKIC.M, Rivas J, Carrón R, Sevilla M.^a, Rodríguez A, Bernabéu C, Pérez-Barriocanal F, López Novoa J. 2002. Endoglina, un componente del complejo de receptores de TGF- β , es un regulador de la estructura y función vascular. *Nefrología* 2002. Vol. XXII. Suplemento 2.
92. JIANG XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120–6.
93. JINNIN M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 2005; 202: 510-7.
94. KADONO T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* 1998; 25: 296-301.
95. KAHALEH MB, LeRoy EC. Interleukin-2 in scleroderma: correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. *Ann Intern Med.* 1989; 110(6):446-50.
96. KAHALEH MB, Fan PS. Mechanism of serum-mediated endothelial injury in scleroderma: identification of a granular enzyme in scleroderma skin and sera. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;83(1):32-40.
97. KARRER S, BosserhoffAK, Weiderer P, DistlerO, LandthalerM, SzeimiesRM, et al.

The 2518 promotor polymorphism in the MCP-1 gene is associated with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2005;124:92-8.

98. KAWAGUCHI Y, Tochimoto A, Hara M, Kawamoto M, Sugiura T, Katsumata Y, et al. NOS2 polymorphisms associated with the susceptibility to pulmonary arterial hypertension with systemic sclerosis: contribución to the transcriptional activity. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R104.
99. KAWAGUCHI Y, Tochimoto A, Ichikawa N, Harigai M, Hara M, Kotake S, et al. Association of IL1A gene polymorphisms with susceptibility to and severity of systemic sclerosis in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 2003; 48:186-92.
100. KAWASHIMA, T., Kawasaki, H., Kitamura Tnojima, Y. & Morimoto, O. (1998). Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDa protein associated with the interleukin-12 receptor beta 1 subunit. *Cell Immunol*, 186, 39-44.
101. KENAN, R. J., Uknis, M. E., Pham, S. M., Spichty, K., Duquesnoy, R. J., Griffith, B. P. & Zeevi A. (1992). Mitogen responses of lymphocytes from lung transplant recipients-correlation with rejection and infection. *Transplantation*, 54, 241-5.
102. KLYUSHNENKOVA E, Mosca JD, Zernetkina V et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005; 12: 47–57.
103. KODERA T, McGaha TL, Phelps R, Paul WE, Bona CA. Disrupting the IL-4 gene rescues mice homozygous for the tight-skin mutation from embryonic death and diminishes TGF-beta production by fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(6):3800-5.
104. KOETTER I, Henes J, Wacker A, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation (auto-pbsct) for treatment-resistant autoimmune diseases. Results of a phase I-II pilot study with 15 patients. Presented at: American College of Rheumatology Meeting; November 2006; Washington, DC. Abstrac 1299.
105. KOHN, D.E., Sarmadi, M., Helman, J. y Krebsbach, P.H. Effects of pH on

Human Bone Marrow Stromal Cells in Culture: Implications for Tissue Engineering of Bone. *J Biomed Mat Res* 60:2 292-299, 2002

106. KOLODSICK JE, Toews GB, Jakubzick C, Hogaboam C, Moore TA, McKenzie A, et al. Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. *J Immunol* 2004; 172:4068-76.
107. KOLF C, Cho E, Tuang R. 2007. Biology of adult mesenchymal Stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research and therapy*, 9:204.
108. KRAMPERA M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F et al.: Role of the IFN- γ in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells* 2005, 24:386-398
109. KRAMPERA M, Glennie S, Dyson J et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722–9
110. KRAMPERA Mauro, Pasini Annalisa, Pizzolo Giovanni, Cosmi Lorenzo, Romagnani Sergio and Annunziato Francesco. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells *Current Opinion in Pharmacology* 2006, 6:435–441.
111. KUNIKATA, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C. & Yamauchi, H. (1998). Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell Immunol*, 189, 135-43.
112. KUWANA M, Inoko H, Kameda H, Nojima T, Sato S, Nakamura K, et al. Association of human leucocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis. *Intern Med* 1999; 38:336-44.
113. LAMBERT NC, Distler O, Muller-Ladner U, et al. HLA-DQA1*0501 is

associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum* 2000;43(9):2005–10.

114. LANCASTER, M.V. and Fields, R.D. 1996. Antibiotic and cytotoxic Drug Susceptibility assays using Resazurin and Posisign agents. U.S. Patent No. 5,501,959.
115. LARGHERO J, Farge D, Braccini A, Lecourt S, Scherberich A, Foïs E, Tyndall A. May 2007. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis*. Published Online First: 25 May 2007. doi:10.1136/071233.
116. LASSO E. 2007. Estandarización de técnica de irradiación celular utilizando dos modelos: el modelo de cultivo primario de fibroblastos y ensayo de Blastogénesis de linfocitos. Católica de Manizales. Facultad de ciencias de las Salud. Bacteriólogo. Universidad Manizales. 77 p.
117. LE BLANC K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5:485-489.
118. LE BLANC K, Rasmusson I, Götherström C et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004; 60: 307–15
119. LE BLANC K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience (Review). *J Intern Med* 2007; 262: 509–525.
120. LE BLANC K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003, 57:11-20.
121. LE BLANC K, Tammik L, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Haematol* 2003; 31: 890–6.

122. LEE CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 2001; 194(6):809-21.
123. LINSEN L, Somers V, Stinissen P. Immunoregulation of autoimmunity by natural killer T-cells. *Hum Immunol* 2005; 66:1193-202.
124. LIU J, Lu XF, Wan L et al. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbredline. *Transplant Proc* 2004; 36: 3272–5.
125. M C VONK, Z Marjanovic, F H J van den Hoogen et. al 2007; *Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. Ann Rheum Dis* 2008;67; 98-104.
126. MC GAHA T, Saito S, Phelps RG, Gordon R, Noben-Trauth N, Paul WE, et al. Lack of skin fibrosis in tight skin (tsk) mice with targeted mutation in the interleukin-4Ralpha and transforming growth factor-beta genes. *J Invest Dermatol* 2001; 116(1):136-43.
127. MACCARIO R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen – specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory / suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005; 90:516-525.
128. MAGNANT J, de Monte M, Guilmot JL, Lasfargues G, Diot P, Asquier E. Relationship between occupational risk factors and severity markers of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2005;32:1713-8
129. MAITRA B, Szekely E, Gjini K et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597–604.
130. MAJUMDAR MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57–66.

131. MARTIN F, Chan AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 2004; 20(5):517-27.
132. MARUYAMA K, Zhang JZ, Nihei Y, Ono I, Kaneko F. Regulatory effects of - interferon on IL-6 and IL-8 secretion by cultured human keratinocytes and dermal fibroblasts. *J Dermatol* 1995; 22:901-6.
133. MAVILIA C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997;151: 751-8.
134. MAYANI H, Lanndslorp PM. 1994. Thy -1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 83: 2410.
135. MEDSGER TA, Jr. Epidemiology of systemic sclerosis. *Clinics in dermatology*. 1994; 12(2):207-16.
136. MEISEL R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103:4619-4621.
137. MORSE J, Barst R, Horn E, Cuervo N, Deng Z, Knowles J. Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenic protein receptor 2 mutations. *J Rheumatol* 2002; 29:2379-81.
138. MUNN D, Shafizdeh E, Affwood J, Bondarey I, Pashine A, Mellor A. Inhibition of T cell proliferation by macrophages tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999; 189:1363-1372.
139. MUNN DH, Zhou M, Attwood JT et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191–3.
140. MUSSO T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. Interleukin—4 inhibits indoleamine 2,3-dioxigenase expression in human monocytes. *Blood* 1994; 83, 5:1408 – 1411.

141. MUNÉVAR JUAN CARLOS. Potencial terapéutico de las células stem en odontología. *Tribuna Odontológica*.2005; 2(2): 44 – 48.
142. NASH R, MCSWEENEY P. Crofford, L J. Muneer A. et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell Transplantation for severe systemic sclerosis: long-term follow-up of the US multicenter pilot study. *Blood*. 2007;110:1388-1396.
143. NASH RA, McSweeney PA, Crofford LJ, et al. 5-Year follow-up of high-dose immunosuppressive therapy (HDIT) for systemic sclerosis (SSc). Presented at: American College of Rheumatology Meeting; November 11-15, 2006; Washington, DC.
144. NAUTA Alma J. and Fibbe Willem E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007; 110:3499-3506.
145. OSSA Humberto; Mantilla Andrea, Quintanilla Sandra, Peña Alejandro. Polimorfismos del sistema HLA (loci A*, B* y DRB1*) en población colombiana. *NOVA - Publicación Científica - Issn:1794-2470 Vol.5 No. 7 Enero - Junio De 2007:1-100*.
146. OTIROPOULOU PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24:74-85.
147. PANAYIOTIS G Vlachoyiannopoulos, Urania G Dafni, Ioannis Pakas, Marylin Spyropoulou-Vlachou, Catherine Stavropoulos-Giokas, Haralampos M. Moutsopoulos. Systemic scleroderma in Greece: low mortality and strong linkage with HLA-DRB1*1104 allele. *Ann Rheum Dis* 2000;59;359-367.
148. PANDEY JP, Takeuchi F. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in systemic sclerosis. *Hum Immunology* 1999; 60:1128-30.
149. PAUL H. KREBSBACH, 2002.Dental and skeletal stem cells: Potencial cellular Therapeutic for craniofacial regeneration. *J. of dental education*. 66 (6): 766-773.

150. PHILIPS N, Bashey RI, Jiminez SA. Increased alpha 1(I) procollagen gene expression in tight skin (TSK) mice myocardial fibroblasts is due to a reduced interaction of a negative regulatory sequence with AP-1 transcription factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 9313–21.
151. PIELA-SMITH TH, Korn JH. Lymphocyte modulation of fibroblast function in systemic sclerosis. *Clinics in dermatology*. 1994;12(3):369-77
152. PITTENGER MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–7.
153. POTIAN JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003; 171: 3426–34.
154. PRELOG M, Scheidegger P, Peter S, Gershwin ME, Wick G, Sgonc R. Diminished transforming growth factor -2 production leads to increased expression of a profibrotic procollagen-2 type I messenger RNA variant in embryonic fibroblasts of UCD-200 chickens, a model for systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1804-11.
155. RAJNISH A. GUPTA and David Fiorentino: Localized scleroderma and systemic sclerosis: Is there a connection? *Practice & Research Clinical Rheumatology* 2007. Vol. 21, No. 6, pp. 1025–1036.
156. RASMUSSEN I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 2007; 65: 336–43
157. RASMUSSEN I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76: 1208–13.
158. RASMUSSEN I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; 305: 33–41.

159. REVEILLE JD, Fischbach M, McNearney T, Friedman AW, Aguilar MB, Lisse J.. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical sociodemographic, serologic and immunogenic determinants. *Semin Arthritis Rheum.* 2001;30:332-46.
160. RICCIERI V, Parisi G, Spadaro A, Scrivo R, Barone F, Moretti T, et al. Reduced circulating natural killer T-cells and / T-cells in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2005; 32:283-6.
161. RINGDEN O, Rynnel-Dago“o” B. Activation of human B and T lymphocytes by protein A of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Immunol* 1978; 8: 47–52.
162. RODRIGUEZ, Libia. Giraldo, Mabel. García, Natalia. Velasquez, Laura. París, Sara. Álvarez Cristian. Garcia Fernando. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín, Colombia. *IBiomédica* 2007;27:537-47
163. RODRIGUEZ V .Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum.* 2005; 10(1): 5. 14.
164. ROUMM AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 1984;27(6):645-53.
165. RUEGEMER JJ, Ho SN, Augustine JA, Schlager JW, Bell MP, McKean DJ, et al. Regulatory effects of transforming growth factor- β on IL-2- and IL-4-dependent T cell cycle progression. *J Immunol* 1990; 144: 1769–76.
166. RUTELLA S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood.* 2006; 108: 1435-1440.
167. SASAKI M, Kashima M, Ito T, Watanabe A, Izumiyama N, Sano M, et al. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1 and TNF- α . *Mediators Inflamm* 2000; 9:155-60.

168. SATO H, Lagan AL, Alexopoulou C, Vassilakis DA, Ahmad T, Pantelidis P, et al. The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50:558-64.
169. SATO S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000; 165(11):6635-43.
170. SATO S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50(6):1918-27.
171. SATO S, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Yanaba K, Hayakawa I, et al. Serum soluble CTLA-4 levels are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43:1261-6.
172. SCHALLMOSER, K et al. 2007. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*; 47:1436-1446.
173. SCHARFFETTER K, Heckmann M, Hatamochi A, Mauch C, Stein B, Riethmüller G, et al. Synergistic effect of tumor necrosis FNT-a and interferon- Y on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 1989; 181:409-19.
174. SCLERODERMA CARE AND RESEARCH. *Journal of the Scleroderma Clinical; Trials Consortium* Volume 3, Number 2 Spring 2006 pag:25.
175. SERPIER H, Gillery P, Salmon-Ehr V, Garnotel R, Georges N, Kalis B, et al. Antagonistic effects of interferon- and interleukin-4 on fibroblast cultures. *J Invest Dermatol* 1997;109: 158-62.
176. STEEN VD; Medsger TA . Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis and Rheumatism*. 2003; 48(2): 516–522.
177. STEEN VD; Medsger TA (2000) Severe organ involvement in systemic

sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis and Rheumatism* 43(11): 2437–2444.

178. SOTIROPOULOU PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24:74-85.
179. SVEGLIATI BARONI S, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354:2667-76.
180. SYKES M, Nikolic B.; Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature*. 2005 Jun 2; 435(7042):620-7.
181. SZEGEDI A, Czirjak L, Unkeless JC, Boros P. Serum cytokine and anti-Fc gamma R autoantibody measurements in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* 1996; 76: 21-3.
182. TAKEMURA H, Suzuki H, Fujisawa H, Yuhara T, Akama T, Yamane K, et al. Enhanced interleukin 6 production by cultured fibroblasts from patients with systemic sclerosis in response to platelet derived growth factor. *J Rheumatol* 1998; 25:1534-9.
183. TAN FK, Stivers DN, Foster MW, Chakraborty R, Howard RF, Milewicz DM, et al. Association of microsatellite markers near the fibrillin 1 gene on human chromosome 15q with scleroderma in a native American population. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1729-37.
184. TAN FK.. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am*. 2003;29:211-37.
185. TEDDER TF, Inaoki M, Sato S. The CD19/21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 1997; 6:107-18.
186. TERNESS, Peter. Chuang, Jing-Jing and Opelz, Gerhard. The immunoregulatory role ofIDO-producing human dendritic cells. *Trends and Immunology* 2006. Vol 27, Issue 2, 68-73.

187. TEW MB, Arnett FC, Reveille JD, Tan FK. Mutations of bone morphogenic protein receptor 2 (BMP2) are not found in patients with primary pulmonary hypertension and underlying connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2829-30.
188. THOMSON JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. 1988. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-1147.
189. TING, A.E; Mays, R.W; Frey, M.R; Hof, W.V; Medicetty, S. y Deans, R. , Critical Therapeutic pathways of adult stem cell repair ; *Reviews in Oncology and Hematology*, 2008 Enero; 65 (1), p.81-93.
190. TOLUSSO B, Fabris M, Caporali R, Cuomo G, Isola M, Soldano F, et al. 238 y 489 TNF-alpha along with TNFR-II gene polymorphisms associated with the diffuse phenotype in patients with systemic sclerosis. *Immunol Lett* 2005;96:103-8
191. TSE WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75: 389–97.
192. TSUCHIYA N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, et al. Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(12):4002-7.
193. TSUKAMOTO H, Nagafuji K, Horiuchi T, et al. A phase I-II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* 2006;65:508–514.
194. TSUKAMOTO H, Nagafuji K, Horiuchi T, et al. High-dose immune suppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for systemic sclerosis: analysis of immune reconstitution. Presented at: American College of Rheumatology Meeting; November 11-15, 2006; Washington, DC. Abstract 690.
195. TYNDALL, Daikeler. Autoimmunity following haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract & Res Clin Haematol* 2007: 349-360.

196. TYNDALL Bocelli-c, L. Bracci, G. Spagnoli, A. Braccini, M. ouchenaki, R. Ceredig, V. Pistoia, I. Martin and A. Tyndall. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology* 2006, 1-6 pg.
197. UEKI A, Isozaki Y, Tomokuni A, Ueki H, Kusaka M, Tanaka S, et al. Different distribution of HLA class II alleles in anti-topoisomerase I autoantibody responders between silicosis and systemic sclerosis patients, with a common distinct sequence in the HLA-DQB1 domain. *Immunobiology* 2001;204:458-65.
198. VAN LAAR JM, McSweeney PA. High-dose immunosuppressive therapy and autologous progenitor cell transplantation for systemic sclerosis. *Jun*;17(2):233-45.
199. VARESIO L, Clayton M, Blasi E, Ruffman R, Radzioch D. Picolonic acid, a catabolite of tryptophan, an the second signal in the activation of IFN- γ - primed macrophages. *J Immunol* 1990; 145:4265-4271.
200. VARGAS-Alarcón G, Granados J, Ibanez de Kasep G, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D.. Association of HLA-DR5 (DR11) with systemic sclerosis (scleroderma) in Mexican patients. *Clin Exp Rheumatol*. 1995; 13:11-6.
201. VÁZQUEZ-Abad D, Rothfield NF. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12:145–57.
202. VERFAILLIE CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002; 1:369-91.
203. WHITFIELD ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(21):12319-24.
204. WIPFF J, Kahan A, Hachulla E, Sibilia J, Cabane J, Meyer O, et al. Association between an endoglin gene polymorphism and systemic sclerosis related pulmonary hypertension. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 622-5.

205. WIPFF J, ALLANORE Y, KAHAN A, MEYER O, MOUTHON L, GUILLEVIN L, et al. Lack of association between the protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (PTPN22)* allele 620W and systemic sclerosis in the French Caucasian population. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:1230-2.
206. WU SP, LENG L, FENG Z, LIU N, ZHAO H, McDONALD C, et al. Macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms and the clinical expression of scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006;54:3661
207. WYNN TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004;4(8):583-94
208. Y. STEPHANIE GU, James Kong, Gurtej S. Cheema, Carl L. Keen, Georg Wick and M. Eric Gershwin. 2008 *The Immunobiology of Systemic Sclerosis*; Elsevier
209. YAMAKAGE A, KIKUCHI K, SMITH EA, LEROY EC, TROJANOWSKA M. Selective upregulation of platelet derived growth factor receptors by transforming growth factor- β in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 1992;175:1227-34.
210. YANNICK ALLANORE, Julien Wipff, Andre´ Kahan, Catherine Boileau. 2007; *Genetic basis for systemic sclerosis*
211. ZHANG W, AN J, INAGAKI Y, et al. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad 3/4 mediates transforming growth factor beta 1 stimulation of alpha 2(I) collagen (*COL1A2*) transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 39237-45.
212. ZHANG W, GE W, LI C et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte- derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 263-71.
213. ZHOU X, TAN FK, WANG N, XIONG M, MAGHIDMAN S, REVEILLE JD, et al. Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2585-92.
214. ZHOU X, TAN FK, REVEILLE JD, WALLIS D, MILEWICZ DM, AHN C, et al. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2990-9.

ANEXOS

ANEXO A. CONSENTIMIENTOS

Anexo A.1 Consentimiento BCSC: (3 páginas)

INFORMACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Las células progenitoras adultas son motivo de investigación en diferentes áreas de la biología y la medicina, ya que de este conocimiento se derivaran grandes avances para el tratamiento de enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes y genéticas.

Este proyecto utilizara el aspirado de médula ósea para incrementar el conocimiento en el área de inmunología, ya que se observara como las células progenitoras adultas controlan y ayudan a la respuesta inmune en pacientes con enfermedades autoinmunes.

Estas células serán utilizadas exclusivamente como material de investigación, en ningún momento su muestra será utilizada con fines de reproducción o clonación humana pues son células madre adultas que no poseen estas características.

El procedimiento de recolección de la muestra de médula ósea estará únicamente a cargo del médico hemato-oncólogo durante el mielograma, la muestra se tomará en conjunto con las muestras que requiera el médico para su diagnóstico. Las condiciones básicas para participar del estudio incluyen comprobar que no haya antecedentes de enfermedades malignas, o enfermedades infecciosas adquiridas, y llenar el consentimiento informado de forma voluntaria adjunto después de recibir toda la información pertinente.

Todas las preguntas acerca del estudio usted las puede realizar consultando a la Dra. Luz Mabel Ávila Portillo 3486868 -5050 o 6292991

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
DONACIÓN DE MUESTRA DE MEDULA ÓSEA
BANCO DE CÉLULAS STEM DE COLOMBIA**

Fecha: _____

Nombre: _____

CC: _____ Edad: _____ Dirección: _____

Departamento: _____

Teléfono: _____ Rh _____

RECUERDE: usted no puede ser donante si se encuentra en alguna de las situaciones siguientes:

- Tiene el sida o está infectada por el virus del sida (tiene anticuerpos)
- Ha mantenido relaciones sexuales a cambio de dinero o drogas
- Esta diagnosticada de coagulopatía congénita (hemofilia) grave y, por tanto, necesita tratamiento con factores de la coagulación de manera continuada

Declaro que:

- Entiendo que la muestra de medula ósea que dono va a ser utilizada solo con fines de investigación que aporta conocimiento sobre la biología, funcionamiento y utilización de células madre. Y no es ningún material para clonación o algo similar
- Entiendo que la información referente a mi persona y a la de mi pariente será tratada de forma confidencial y codificada de forma que quede protegida mi identidad.
- Consiento que durante el mielograma se me extraiga 5 ml de sangre en tubo heparinizado (tapa verde) en el momento que el médico realice una punción de la cresta iliaca.
- Entiendo que la donación es altruista y que no derivara en ninguna compensación.
- Conservo la posibilidad de renunciar a este consentimiento.
- He leído y comprendido toda la información dada, estoy satisfecha de la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para la donación de sangre de médula ósea.

Nombre y firma del informador

Firma de la donante

Todos los pacientes llenaran la siguiente forma, previa a la toma de muestras y recopilación pertinente. Esta es una forma previa a la forma previa a la toma de muestras y recopilación pertinente. Esta es una forma de aceptación para participar en la investigación.

El propósito de este estudio es evaluar la respuesta del linfocito T de pacientes con enfermedades reumáticas frente a mitógenos, y alóreactividad en cocultivo con células mesenquimales

Usted puede firmar libremente si esta de acuerdo en los siguientes aspectos:

1. Yo _____ con c.c. _____ de _____ con dirección _____ Telefono _____ Celular _____
2. Se le invita a participar en un estudio de investigación, es necesario que decida si participara libremente, tome el tiempo que requiera para decidirse, lea cuidadosamente este formulario y pregunte cualquier duda o inquietud que le surja.
3. El presente estudio será realizado en el Banco de Células Stem de Colombia, el servicio de Reumatología del Hospital Militar y El laboratorio Ceria Ltda.
4. A usted se le tomara muestra de sangre venosa.
5. Por su participación en este estudio usted no sufrirá ningún efecto adverso, el riesgo es mínimo, puede presentar dolor en el momento de la toma de la muestra de sangre, mínimo sangrado y ocasionalmente puede presentarse un pequeño hematoma.
6. Al usted participar en este estudio brindara la oportunidad de estudiar las células progenitoras que diferencian a células implicadas en su enfermedad lo cual podría generar futuras propuestas desde el punto de vista terapéutico y ampliar el conocimiento de su enfermedad.
7. Todas las preguntas acerca del estudio usted las puede realizar consultando a la Dra. Luz Mabel Ávila Portillo 3486868 -5050 o 6292991

Nombre testigo 1 _____ Testigo 2 _____
C.C. _____ C.C. _____
Dirección _____ Dirección _____
Relación con el paciente _____ Relación con el paciente _____
Fecha _____ Fecha _____

Nombre del paciente _____
Investigador _____ Fecha _____ dd/mm/aa

Firma Paciente
c.c.

ANEXO A.2 Consentimiento de HOMIC:

CONSENTIMIENTO

AUTORIZACION PARA EL USO DE MUESTRA DE SANGRE PARA TRABAJO DE INVESTIGACION

El presente es un formato de aceptación para que mi muestra de sangre (o la de mi pariente sea usada en un estudio sobre esclerosis sistémica. La esclerosis sistémica es una enfermedad autoinmune de tejido conectivo cuyo diagnostico se basa en manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio. El monitoreo de la enfermedad, es de gran importancia ya que permite valorar la severidad, respuesta del paciente frente al tratamiento y tener un seguimiento del curso de la enfermedad. Por este motivo la muestra tomada será estudiada para ver su contenido de sustancias que ayuden al seguimiento de la enfermedad.

Conozco que para el estudio de la enfermedad que tengo (o mi pariente), es necesario que tomen una muestra de sangre, por lo que autorizo para que una parte de la muestra sea usada en estudios, proyectos, análisis serológicos, genéticos y demás, como traslados fuera de las instituciones a cargo (HMC/BCSC).

Por la donación de la sangre no obtendré ningún beneficio directo, pero mi ayuda en el futuro podría beneficiar a los pacientes que padecen escleroderma, al obtenerse resultados científicos con el suero obtenido de la sangre tomada. Los investigadores y médicos que me atienden, me han dado la información de manera comprensible y se han comprometido a dar respuesta a otras preguntas que me puedan surgir.

Si después de haber firmado esta autorización, no deseo donar la muestra, puedo negarme, con el único compromiso de informar oportunamente a los investigadores. En cualquier momento, puedo pedir información sobre el uso dado a la muestra donada.

Después de haber sido informado, reconozco que entendí cuales son los objetivos de la investigación y han sido aclaradas mis dudas, por lo tanto acepto voluntariamente donar la muestra solicitada sin más beneficios que los pactados previamente. Para constancia firmo el presente consentimiento informado en la ciudad _____ a los ____ días del mes de _____ del año _____.

Paciente (o Acudiente)
Firma y C.C.

Testigo 1
Firma y C.C.

Investigador Responsable
Firma y C.C.

Testigo 2
Firma y C.C.

ANEXO A.3 Registro de Procesamiento y Seguimiento de Células MO:

FECHA:
REGISTRO DE SEGUIMIENTO DE CÉLULAS DE MEDULA OSEA

A. MEDULA OSEA

MEDICO		
NOMBRE PACIENTE		
CLINICA		
VOLUMEN		
RECuento DE CELULAS NUCLEADAS		
CELULAS CD34+		
VIABILIDAD		
FILTRACIÓN		

B. GRADIENTE DE DENSIDAD

PROCESO		
VOLUMEN DE BUFFY COAT		
VOLUMEN DE PBS		
VOLUMEN DE FICOLL		
CENTRIFUGACIÓN 1800rpm -30m		
LAVADO 1		
LAVADO 2		
LAVADO 3		

C. RECuento DE NEWBAUER

	POSICIÓN 1 (Cel/ml)	POSICIÓN 2 (Cel/ml)	POSICIÓN 3 (Cel/ml)	POSICIÓN 4 (Cel/ml)	Concentración Celular (Cel/ml)
Cel. Vi/mo					
Cel. Vi/mo					

D. CELULAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

CÉLULAS (hMSC, CMN)			
Inóculo (Cells/cm2)		Pase	
Fecha inicio cultivo		Fecha de finalización	

Area cultivo (cm2)	
Volumen medio (mL)	
Medio	
Suplemento (v/v)%	
Lote suplemento	
Control esterilidad medio	

B. Recambio de medio

Fecha	Volumen (mL)	Obseraciones

Motivo finalización cultivo: Subcultivo. ____ Contaminación ____ Final experimento ____

C. Tripsinización y presa de muestra

Volumen Tripsina (mL)	
Volumen Medio inact. (mL)	
Volumen final muestra (mL)	

SEGUIMIENTO DE CULTIVO CELULAR

D. Recuento de newbauer

	POSICIÓN 1 (Cel/ml)	POSICIÓN 2 (Cel/ml)	POSICIÓN 3 (Cel/ml)	POSICIÓN 4 (Cel/ml)	Concentración Celular (Cel/ml)
Día del cultivo					
Cel. Vi/mo					
Cel. Vi/mo					

	POSICIÓN 1 (Cel/u.area)	POSICIÓN 2 (Cel./u.area)	POSICIÓN 3 (Cel./u.area)	POSICIÓN 4 (Cel./u.area)	Concentración Celular (Cel/cm ²)
Cel. Vi/mo					
Cel.					

E. Análisis citometría

	Si No	Recuento por Citometría		Si No	Fenotipo	
					% POSITIVO	% NEGATIVO
EVENTS MSC					CD45	
EVENTS BEADS					CD14	
CONCENTRACIÓN BEADS					CD105	
LOT BEADS					CD73	
CONCENTRACIÓN CELULAR					CD90	
TOTAL CELULAS					HLA-DR	
					CD166	
					CD44	
					CD31	

COMENTARIOS:

ANEXO B. TABLAS DE RESULTADOS HLA (Parte I)

Tabla 1.a Frecuencias Alelos HLA A

ALELO	SSc; n=22	Controles; n=90	Total; n=112
A 1	18.18% (4)	7.77% (7)	9.82% (11)
A 2	18.18% (4)	18.75% (21)	22.32% (25)
A 3	4.54% (1)	3.33% (3)	3.57% (4)
A 23 (9)	0% (0)	3.33% (3)	2.67% (3)
A 24 (9)	40.9% (9)	33.66% (33)	37.5% (42)
A 25 (10)	0% (0)	6.66% (6)	5.35% (6)
A 26 (10)	4.54% (1)	8.88% (8)	8.03% (9)
A 29 (19)	13.63% (3)	10% (9)	10.71% (12)
A 30 (19)	4.54% (1)	5.55% (5)	5.35% (6)
A 31 (19)	18.18% (4)	2.22% (2)	5.35% (6)
A 32 (19)	4.54% (1)	3.33% (3)	3.57% (4)
A 33 (19)	9.09% (2)	10% (9)	9.82% (11)
A 34 (19)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
A 18	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)
A 11	9.09% (2)	4.44% (4)	5.35% (6)
A 80	0% (0)	0% (0)	0% (0)
A 68	4.54% (1)	6.66% (6)	6.25% (7)
A 28	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
A 69	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)
A 10.2	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)
A 10	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
A 36	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
A 19	0% (0)	4.44% (4)	3.57% (4)
A 1.36	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
A 74	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)

Tabla 1.b Frecuencias Alelos HLA-B

ALELO	SSc; n=22	Controles; n=90	Total n=112
B 7	13.63% (3)	11.11% (10)	11.6% (13)
B 8	9.09% (2)	4.44% (4)	5.35% (6)
B 13	0% (0)	4.44% (4)	3.57% (4)
B 64 (14)	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
B 65 (14)	13.63% (3)	1.11% (1)	3.57% (4)
B 15	0% (0)	5.55% (5)	4.46% (5)
B 63 (15)	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
B 18	4.54% (1)	5.55% (5)	5.35% (6)
B 27	0% (0)	4.44% (4)	3.57% (4)
B 35	59.09% (13)	25.55% (23)	32.14% (36)
B 38	4.54% (1)	5.55% (5)	5.35% (6)
B 39	9.09% (2)	7.77% (7)	8.03% (9)
B 60 (40)	4.54% (1)	0% (0)	0.89% (1)

B 41	4.54% (1)	0% (0)	0.89% (1)
B 46	4.54% (1)	0% (0)	0.89% (1)
B 42	0% (0)	3.33% (3)	2.67% (3)
B 48	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)
B 49 (21)	0% (0)	7.77% (7)	6.25% (7)
B 50 (21)	9.09% (2)	2.22% (2)	3.57% (4)
B 51 (5)	9.09% (2)	14.44% (13)	13.39% (15)
B 52 (5)	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
B 53	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
B 55	0% (0)	3.33% (3)	2.67% (3)
B 56	4.54% (1)	0% (0)	0.89% (1)
B 58 (17)	4.54% (1)	5.55% (5)	5.35% (6)
B 40 (60/61)	13.63% (3)	24.44% (22)	22.32% (25)
B 14	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
B 4	4.54% (1)	0% (0)	0.89% (1)
B 17	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
B 61	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)
B 16	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)

Tabla 1.c Frecuencias Alelos HLA-DR

ALELO	SSc; n=22	Controles; n=90	Total n=112
DR 1	22.72% (5)	16.16% (15)	17.85% (20)
DR 4	40.9% (9)	41.11% (37)	41.07% (46)
DR 7	4.54% (1)	15.55% (14)	13.39% (15)
DR 8	22.72% (5)	13.33% (12)	15.17% (17)
DR 9	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
DR 10	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
DR 11	36.36% (8)	12.22% (11)	16.96% (19)
DR 12	0% (0)	1.11% (1)	0.89% (1)
DR 13	4.54% (1)	15.55% (14)	13.39% (15)
DR 14	0% (0)	17.77% (16)	14.28% (16)
DR 15	9.09% (2)	21.11% (19)	18.75% (21)
DR 16	0% (0)	2.22% (2)	1.78% (2)
DR 17	4.54% (1)	7.77% (7)	7.14% (8)
DR 18	4.54% (1)	0% (0)	0.89% (1)

Tabla 1.a, 1.b y 1.c. Frecuencias Alélicas para los loci HLA-A, B y DR. Cada tabla representa las Frecuencias observadas para cada uno de los alelos HLA-A, B y DR respectivamente; cada tabla proporciona las frecuencias relativas en razón de grupo: SSc (n=22), Control (n=90) y frecuencia Total "poblacional" ($n_{SSc} + n_{Control} = 112$)

Tabla 2.a Agrupación de Datos HLA-A

ALELO	P	Phi	Montecarlo Sig. Exacta	Intervalo Confianza 95% Limite Inferior	Limite Superior
A 1	0.222*	0.139	0.295	0.210	0.379
A 2	0.557*	-0.075	0.616	0.526	0.706
A 3	0.253*	0.111	0.232	0.154	0.310
A 23 (9)	1.0*	-0.082	0.634	0.545	0.723
A 24 (9)	1.0*	0.007	1.000	0.974	1.000
A 10	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
A 10.2	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
A 25 (10)	0.596*	-0.118	0.420	0.328	0.511
A 26 (10)	0.686*	-0.063	0.679	0.592	0.765
A 11	0.336*	0.082	0.625	0.535	0.715
A 18	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
A 19	0.581*	-0.107	0.625	0.535	0.715
A 29 (19)	0.409*	0.082	0.402	0.311	0.493
A 30 (19)	1.0*	-0.018	1.000	0.974	1.000
A 31 (19)	0.013*	0.282	0.018	0.000	0.042
A 32 (19)	1.0*	0.026	1.000	0.974	1.000
A 33 (19)	1.0*	-0.012	1.000	0.974	1.000
A 34 (19)	NO	NO	NO	NO	NO
A 28	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
A 36	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
A 68	1.0*	-0.035	1.000	0.974	1.000
A 69	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
A 74	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
A 80	1.0*	-0.082	0.634	0.545	0.723
A 1.36	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000

Tabla 2a. Agrupación de Datos HLA-A. La Tabla 2, Muestra el valor de p , ϕ , Sig. Exacta e intervalo de confianza con 0.05 de nivel de significancia para cada uno de los alelos HLA-A estudiados. El valor de p se calculó empleando la prueba Chi Cuadrado y Test exacto de Fischer* según aplicara el caso. La tabla 2 muestra asociación entre las variables Esclerosis Sistémica y expresión del alelo HLA-A31 [$pF=0.013^*$, $pMontecarlo=0.018$ (0.282); $p < 0.05$].

Tabla. 2b Agrupación de Datos HLA-B

ALELO	P	Phi	Montecarlo	Intervalo Confianza 95% Limite Inferior	Limite Superior
B 4	0.196*	0.192	0.268	0.186	0.350
B 7	0.717*	0.031	1.000	0.974	1.000
B 8	0.336*	0.082	0.625	0.535	0.715
B 12	NO	NO	NO	NO	NO
B 13	0.584*	-0.095	0.625	0.535	0.715
B 14	0.485*	0.057	1.000	0.974	1.000
B 64 (14)	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
B 65 (14)	0.098*	0.196	0.027	0.000	0.057
B 15	0.342*	-0.128	0.411	0.320	0.502
B 63 (15)	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
B 16	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
B 17	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
B 58 (17)	1.0*	-0.018	1.000	0.974	1.000

B 18	1.0*	-0.018	1.000	0.974	1.000
B 27	0.584*	-0.095	0.625	0.535	0.715
B 35	0.003 /0.004*	0.285	0.009	0.000	0.026
B 38	1.0*	-0.018	1.000	0.974	1.000
B 39	0.654*	0.037	1.000	0.974	1.000
B 40	0.397*	-0.094	0.491	0.398	0.584
B 60 (40)	0.196*	0.192	0.268	0.186	0.350
B 61 (40)	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
B 41	1.0*	-0.082	0.634	0.545	0.723
B 42	1.0*	-0.082	0.634	0.545	0.723
B 44	0.206*	-0.155	0.286	0.202	0.369
B 46	0.196*	0.192	0.268	0.186	0.350
B 47	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
B 48	1.0*	-0.047	1.000	0.974	1.000
B 49	0.342*	-0.128	0.411	0.320	0.502
B 50	0.172*	0.147	0.143	0.078	0.208
B 51	0.731*	-0.062	0.732	0.650	0.814
B 52	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
B 53	1.0*	-0.067	1.000	0.974	1.000
B 55	1.0*	-0.082	0.634	0.545	0.723
B 56	0.196*	0.192	0.268	0.186	0.350

Tabla 2.b Agrupación de datos HLA-B. La Tabla 3 asociación entre las variables Esclerosis Sistémica y Expresión del alelo HLA-B35 [$p\chi^2= 0.003$, $pF= 0.004^*$, $pMontecarlo= 0.009$ (0.285); $p < 0.05$] y alelo HLA-B64(14) [$pMontecarlo= 0.027$ (0.196); $p < 0.05$].

Tabla 2.c. Agrupación de datos HLA-DR.

ALELO	P	Phi	Montecarlo Sig. exacta	Intervalo Confianza 95% Limite Inferior	Limite Superior
DR 1	0.539*	(0.63)	0.509	0.416	0.602
DR4	0.862/1.0*	(0.016)	1.0	0.974	1.000
DR 7	0.186*	(-0.149)			
DR 8	0.320*	(0.104)	0.205	0.227	0.398
DR 9	1.0*	(-0.067)	1.0	0.974	1.000
DR 10	1.0*	(-0.067)	1.0	0.974	1.000
DR 11	0.025*	(0.239)	0.027	0.000	0.057
DR 12	1.0*	(-0.047)	1.0	0.974	1.000
DR 13	0.296*	(-0.119)	0.268	0.180	0.350
DR 14	0.022*	(-0.209)	0.045	0.006	0.083
DR 15	0.238*	(-0.122)	0.232	0.154	0.310
DR 16	1.0*	(-0.067)	1.0	0.974	1.000
DR 17	1.0*	(-0.035)	1.0	0.974	1.000
DR 18	0.196*	(0.192)	0.223	0.146	0.300

Tabla 2.c Agrupación de datos HLA-DR. La Tabla 2.c Muestra asociación estadísticamente significativa entre las variables Esclerosis Sistémica y la expresión del alelo HLA-DR 11 [0.025* (0.239); $p < 0.05$]. Por otra parte el alelo DR 14 se asociaría con un posible efecto protector hacia la enfermedad [0.022* (-0.209); $p < 0.05$].

ANEXO C. RESULTADOS SEROLOGICOS

Tabla 3.a Estadísticos ENAS, Sci70, ACAS y APL.

ESTADÍSTICOS								
		ENAS RO	ENAS LA	ENAS RNP	ENAS Sm	Sci70	ACAS IgM	ACAS IgG
N	Válidos	26	26	26	25	24	23	23
	Perdidos	0	0	0	1	2	3	3
	Media	9.9865	0.8769	8.5500	2.6160	7.7750	12.5174	10.9217
	Mediana	1.5500	0.7000	2.3000	1.5000	2.7500	8.7000	9.5000
	Moda	0.60 ^a	0.10 ^a	0.20	0.10 ^a	1.60 ^a	4.70 ^a	5.60
	Desv. típ.	19.3110	0.6889	17.9484	5.81812	15.2080	12.2018	6.68791
a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.								
		APL IgM	APL IgG					
N	Válidos	15	15					
	Perdidos	11	11					
	Media	1.8533	2.4200					
	Mediana	0.8000	1.6000					
	Moda	0.10 ^a	0.60 ^a					
	Desv. típ.	2.34334	1.95419					
a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.								

Tabla 3.a Estadísticos ENAS, Sci70, ACAS y APL. La tabla 3.a Muestra Media, Mediana, Moda y Desviación Estándar (DE) para cada una de las pruebas.

Tabla 3.b Frecuencias de Positividad en Exámenes Serológicos

PRUEBA		POSITIVO	NEGATIVO	% POS	% NEG	TOTAL
ENAS	RO	5	21	19.2 %	80.8 %	26*
	LA	0	26	0%	100%	26
	RNP	3	23	11.5 %	88.5 %	26
	Sm	1	25	3.8 %	96.2 %	26
ACAS	IG M	3	20	13%	87%	23*
	IG G	2	21	8.7 %	91.3 %	23
APL	IG M	0	16	0%	100%	16
	IG G	0	16	0%	100%	16
Sci-70		4	20	16.7 %	83.3%	24*
ANAS		22	3	88%	12%	25*

Tabla 3.b. Frecuencias de Positividad en Exámenes Serológicos (Escleroderma).

ANEXO D. TABLAS DE RESULTADOS HLA (II parte)

Tabla 4ª Asociación HLA-A y Positividad de Exámenes.

ALELO	ANAS p-Value	ENAS				Sci70 p-Value	ACAS		APL	
		RO p-Value	LA p-Value	RNP p-Value	Sm p-Value		Ig M p-Value	Ig G p-Value	Ig M p-Value	Ig G p-Value
A 1	0.358	0.554	NO	1.0	1.0	0.554	1.0	1.0	NO	NO
A 2	0.271	1.0	NO	0.260	1.0	0.47	0.404	1.0	NO	NO
A 3	1.0	0.338	NO	0.177	0.091	0.338	1.0	0.195	NO	NO
A 24 (9)	1.0	1.0	NO	0.494	1.0	1.0	1.0	NO	NO	NO
A 26 (10)	1.0	1.0	NO	0.091	0.045	1.0	1.0	1.0	NO	NO
A 11	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	0.284	1.0	NO	NO
A 29 (19)	1.0	0.47	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
A 30 (19)	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
A 31 (19)	0.352	1.0	1.0	1.0	1.0	0.554	1.0	0.368	NO	NO
A 32 (19)	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
A 33 (19)	1.0	0.338	NO	0.177	1.0	0.338	1.0	1.0	NO	NO
A 68	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	0.182	0.150	1.0	NO	NO

Tabla 4.b Asociación HLA-B y Positividad de Exámenes.

ALELO	ANAS p-Value	ENAS				Sci70 p-Value	ACAS		APL	
		RO p-Value	LA p-Value	RNP p-Value	Sm p-Value		Ig M p-Value	Ig G p-Value	Ig M p-Value	Ig G p-Value
B 4	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	NO	NO
B 7	1.0	1.0	NO	0.26	0.136	0.073	1.0	1.0	NO	NO
B 8	0.186	0.338	NO	1.0	1.0	0.338	1.0	0.195	NO	NO
B 14	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 65 (14)	1.0	0.338	NO	0.177	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 58 (17)	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	NO	NO	NO	NO
B 18	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 35	0.486	1.0	NO	0.156	0.409	1.0	0.521	0.111	NO	NO
B 38	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 39	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	0.100	NO	NO
B 40	1.0	0.073	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 60 (40)	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	0.182	0.150	1.0	NO	NO
B 46	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 50	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0.016	1.0	NO	NO
B 51	0.186	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	NO	NO
B 56	1.0	1.0	NO	0.091	0.045	1.0	1.0	1.0	NO	NO

Tabla 4.c Asociación HLA-DR y Positividad de Exámenes.

ALELO	ANAS p-Value	ENAS				Sci70 p-Value	ACAS		APL	
		RO p-Value	LA p-Value	RNP p-Value	Sm p-Value		Ig M p-Value	Ig G p-Value	Ig M p-Value	Ig G p-Value
DR 1	1.0	0.535	NO	1.0	1.0	1.0	0.509	0.368	NO	NO
DR 4	1.0	1.0	NO	0.494	1.0	0.616	1.0	0.189	NO	NO
DR 7	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	NO	NO	NO	NO
DR 8	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	0.535	1.0	1.0	NO	NO
DR 11	0.133	0.254	NO	1.0	0.364	0.254	1.0	0.521	NO	NO
DR 13	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	1.0	NO	NO	NO	NO
DR 15	1.0	0.338	NO	0.177	1.0	0.338	1.0	1.0	NO	NO
DR 17	1.0	0.182	NO	1.0	1.0	0.182	1.0	0.100	NO	NO
DR 18	1.0	1.0	NO	1.0	1.0	0.182	1.0	1.0	NO	NO

Tablas 4ª, 4b y 4c. Tablas de asociación entre los alelos HLA-A, B y DR y positividad de los exámenes ANAS, ENAS (RO, LA, RNP, Sm), Sci70, ACAS y APL. En cada tabla se muestra el valor de *p-Value* calculado por el Test exacto de Fisher (*pF*). NO= Valores constantes no permiten calcular *p-Value*.

ANEXO E CURVAS DE CALIBRACION ALAMAR BLUE

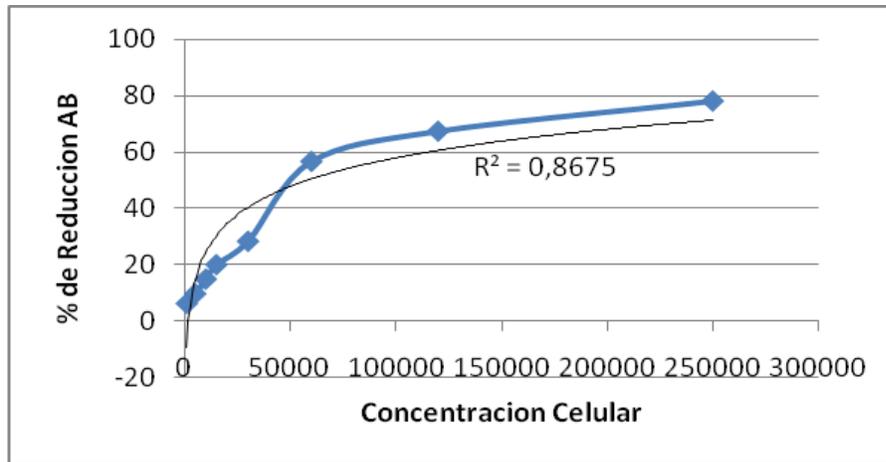


Grafico. Curva de Calibración Alamar Blue (AB): Concentración Celular versus % Reducción AB.

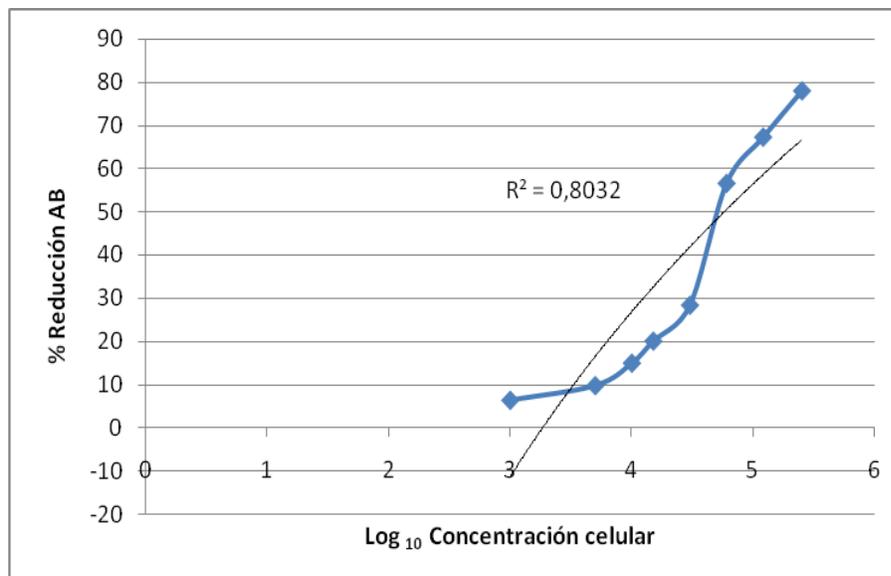


Grafico. Curva de Calibración Alamar Blue (AB): Log₁₀ Concentración Celular versus % Reducción AB.

Anexo F. Modelo de Siembra Ensayo de Aloreactividad y Blastogénesis.

	A	B	C	D	E	F	G	H
12	Pool:100µ L PHA5 µL	MSC3:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL IX:100 µL	I: 100µL MSC3:50µl IX: 100µL	Pool:100µ L PHA5 µL	MSC3:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL IX:100 µL	II: 100µL MSC3:50µl IX: 100µL
11	Pool:100µ L PHA5 µL	MSC3:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL IX:100 µL	I: 100µL MSC3:50µ IX: 100µL	Pool:100µ L PHA5 µL	MSC3:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL IX:100 µL	II: 100µL MSC3:50µ IX: 100µL
10	Pool:100µ L PHA5 µL	MSC3:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL IX:100 µL	I: 100µL MSC3:50µ IX: 100µL	Pool:100µ L PHA5 µL	MSC3:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL IX:100 µL	II: 100µL MSC3:50µ IX: 100µL
9	I: 100µL PHA 5 µL	MSC2:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL MSC3:50µ	I: 100µL MSC2:50µ IX: 100µL	II: 100µL PHA 5 µL	MSC2:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL MSC3:50µ	II: 100µL MSC2:50µ IX: 100µL
8	I: 100µL PHA 5 µL	MSC2:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL MSC3:50µ	I: 100µL MSC2:0µ IX: 100µL	II: 100µL PHA 5 µL	MSC2:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL MSC3:50µ	II: 100µL MSC2:0µ IX: 100µL
7	I: 100µL PHA:5 µL	MSC2:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL MSC3:50µ	I: 100µL MSC2:50µ IX: 100µL	II: 100µL PHA:5 µL	MSC2:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL MSC3:50µ	II: 100µL MSC2:50µ IX: 100µL
6	I: 100µL pool:100µL	MSC1:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL MSC2:50µ	I: 100µL MSC1:50µ IX: 100µL	II: 100µL pool:100µL	MSC1:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL MSC2:50µ	II: 100µL MSC1:50µ IX: 100µL
5	I: 100µL pool:100µL	MSC1:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL MSC2:50µ	I: 100µL MSC1:50µ IX: 100µL	II: 100µL pool:100µL	MSC1:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL MSC2:50µ	II: 100µL MSC1:50µ IX: 100µL
4	I: 100µL pool:100µL	MSC1:50µ L PHA 5 µL	I: 100µL MSC2:50µ	I: 100µL MSC1:50µ IX: 100µL	II: 100µL pool:100µL	MSC1:50µ L PHA 5 µL	II: 100µL MSC2:50µ	II: 100µL MSC1:50µ IX: 100µL
3	I: 100µL	I: 100µL pool:100µL PHA 5 µL	I: 100µL MSC1:50µ	I: 100µL IX:100 µl PHA5 µL	II: 100µL	II: 100µL pool:100µL PHA 5 µL	II: 100µL MSC1:50µ	II: 100µL IX:100 µl PHA5 µL
2	I: 100µL	I: 100µL pool:100µL PHA 5 µL	I: 100µL MSC1:50µ	I: 100µL IX:100 µl PHA5 µL	II: 100µL	II: 100µL pool:100µL PHA 5 µL	II: 100µL MSC1:50µ	II: 100µL IX:100 µl PHA5 µL
1	I: 100µL	I: 100µL pool:100µL PHA 5 µL	I: 100µL MSC1:50µ	I: 100µL IX:100 µl PHA5 µL	II: 100µL	II: 100µL pool:100µL PHA 5 µL	II: 100µL MSC1:50µ	II: 100µL IX:100 µl PHA5 µL

I: Paciente Respondedor; **Pool:** Paciente Irradiado; **IX:** Individuo Estimulador; **MSC1:** Dilución 1/1; **MSC2:** Dilución 1/10; **MSC3:** Dilución 1/100. **PHA:** Fitohemaglutinina. **Nota:** Todos los pozos se llevaron a 250 µL de volumen final se completaba con RMP II suplementado 10% SFB.