



Universidad
de Navarra

Facultad de Ciencias

ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN
SANGRE PERIFÉRICA Y ÓRGANOS LINFOIDES PARA
SU APLICACIÓN EN EL ÁMBITO CLÍNICO

Tesis Doctoral

José Antonio Delgado García

Pamplona 2018

D.^a Juana Merino Roncal, Profesora Adjunta de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra y Consultor de la Clínica Universidad de Navarra,

Informa:

Que el presente trabajo, titulado “**Análisis de subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica y órganos linfoides para su aplicación en el ámbito clínico**” ha sido realizado bajo su dirección por D. José Antonio Delgado García para optar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

Fdo. Dra. D.^a Juana Merino Roncal

A mis padres, Remedios y José Antonio, a quienes debo todo lo que soy.

A mi mujer, María y mis hijos, Lucas y Alejandro, quienes sufren lo que soy.

Su apoyo constante e incondicional es el pilar que sustenta mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Juana Merino, a la que considero mi mentora y un ejemplo a seguir. Simplemente me siento orgulloso de los valores y el conocimiento que me ha otorgado.

Al Dr. Alfonso Sánchez-Ibarrola, porque me dio la oportunidad de formar parte de un gran equipo, confió en mí y me enseñó el valor del trabajo.

A la Dra. Cristina Moreno, mi "jefa favorita". Por guiarme en todo momento en mi aprendizaje como especialista, que es el 90% de lo que significa ser una gran tutora.

A la Clínica Universidad de Navarra, a la Universidad de Navarra y a la Universidad Complutense de Madrid, a las que debo toda mi formación académica.

A los doctores Eduardo Loza, M^a Natividad del Val y M^a Concepción Fito, por su valiosa colaboración y dedicación profesional en este proyecto.

Al Departamento de Reumatología de la Clínica Universidad de Navarra, por su colaboración en el envío de muestras de pacientes tratados con Rituximab.

Al servicio de extracciones, en especial a Conchi, por su continua ayuda en la toma y organización todas las muestras.

A todos los pacientes que a pesar de su enfermedad han encontrado la fuerza y la valentía de donar sangre voluntariamente en aras del progreso científico.

A Laura E., Raquel, Laura G y Elena, porque me han enseñado lo que es el trabajo de laboratorio y siempre han estado a mi lado para ayudarme.

A Esther, Carmen, Juanjo, Laura, Paula y Silvia, mis compañeros de residencia, por su ayuda y porque juntos recorrimos un camino en el que compartimos conocimientos muy valiosos.

A mis hermanos, Jesús y Joaquín, porque ellos me completan, los tres somos uno y por ello a pesar de la distancia siempre he sentido su apoyo e ilusión.

A mis abuelos, especialmente a Mercedes, quien me enseñó desde que nací el valor del estudio constante y la importancia de no rendirse ante la dificultad.

A mis amigos, en especial Alberto, por el tiempo robado y porque a pesar de la distancia siempre estuvo a mi lado en los momentos de dificultad.

A Diego e Idoya, por ayudarme y aconsejarme, y por supuesto a Leire Burgos, porque gracias a ella cada vez que miro las estrellas solo pienso en "gatearlas".

Índice

INTRODUCCIÓN	15
1. ANÁLISIS DE LINFOCITOS B POR CITOMETRÍA PARA MONITORIZACIÓN DE TRATAMIENTO CON RITUXIMAB EN PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	16
2. CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALTA SENSIBILIDAD.....	21
3. PANEL DE MARCADORES PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL COMPARTIMENTO B.....	24
PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	32
1. HIPÓTESIS	33
2. OBJETIVOS	33
MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	36
2. CONFIGURACIÓN DEL CITÓMETRO.....	37
2.1. Calibración y compensación	37
3. PROTOCOLO DE CITOMETRÍA.....	39
3.1. Estándar.....	39
3.2. Marcaje con inmunoglobulinas de superficie	39
3.3. Alta sensibilidad	39
3.4. Adquisición de muestras y análisis	40
4. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO SIMPLIFICADO DE CITOMETRÍA DE ALTA SENSIBILIDAD	41
4.1. Análisis de máxima tasa de flujo en la adquisición de muestras.....	41
4.2. Análisis de máxima concentración celular en el marcaje de muestras.	42
5. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES B	43
5.1. Caracterización B normal.....	43
5.2. Análisis de contaminación con sangre periférica en muestras de médula ósea.....	45
5.3. Muestras de PAAF de tiroides	49
5.4. Pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con Rituximab	50
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53

RESULTADOS.....	55
A. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO SIMPLIFICADO DE CITOMETRÍA DE ALTA SENSIBILIDAD.....	56
1. MÁXIMA TASA DE FLUJO EN LA ADQUISICIÓN DE MUESTRAS.....	56
1.1. Análisis de abortos electrónicos en muestras adquiridas a diferente tasa de flujo.....	56
1.2. Análisis de poblaciones en muestras adquiridas a diferente tasa de flujo	58
2. MÁXIMA CONCENTRACIÓN CELULAR EN EL MARCAJE DE MUESTRAS.....	60
2.1. Comparación de marcaje a 20, 40 y 80 millones de células/mL.....	60
2.1.1. Concentración de AcMo.....	60
2.1.2. Tasa de flujo.....	61
2.1.3. Número de leucocitos adquiridos.....	62
2.1.4. Estudio de subpoblaciones.....	62
2.1.4.1. Análisis de precisión.....	65
2.1.4.2. Análisis de exactitud.....	65
2.2. Comparación de marcaje a 20 y 30 millones de células/mL.....	67
3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA MUESTRA.....	70
3.1. Desarrollo de un sistema que evalúe el grado de hemodilución de una muestra de médula ósea.....	70
3.1.1. Concentración leucocitaria en muestras de MO en función de la calidad de la muestra.....	74
3.1.2. Influencia de la calidad de la muestra sobre la disparidad observada entre medulograma y citometría.....	76
3.1.3. Análisis discriminante de las variables utilizadas para evaluar el grado de contaminación de una muestra de médula ósea con sangre periférica.....	76
3.1.4. Establecimiento de un punto de corte para considerar una muestra hemodiluida.....	77
3.1.5. Cantidad de sangre contaminante necesaria para alcanzar el punto de corte establecido.....	78
3.2. Aplicación del sistema ICSP a muestras patológicas.....	80

B. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B	82
1. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS.....	83
1.1. Protocolo de análisis en MO (Figura 16).....	83
1.2. Protocolo de análisis en SP.....	88
1.3. Protocolo de análisis en tejido linfoide.....	88
2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE SUBPOBLACIONES B.....	90
3. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B	93
3.1. Influencia de la calidad de la muestra de MO sobre el análisis de	
distribución de subpoblaciones B.....	96
4. APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS	
B AL CRIBAJE DE SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO CRÓNICO B (SLP-	
B): UTILIDAD DE LA INCLUSIÓN DE UN MARCADOR DE CG EN EL	
ANÁLISIS DE TEJIDO LINFOIDE.....	99
C. ANÁLISIS DE ALTA SENSIBILIDAD DE SUBPOBLACIONES	
LINFOCITARIAS B PARA SEGUIMIENTO DE TRATAMIENTO CON	
RITUXIMAB EN PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES.	103
1. PATRÓN DE RECONSTITUCIÓN B TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE	
RITUXIMAB.....	103
2. SUBPOBLACIONES B PERSISTENTES TRAS EL TRATAMIENTO	
CON RITUXIMAB.....	111
DISCUSIÓN	119
1. ASPECTOS TÉCNICOS RELATIVOS AL ANÁLISIS DE	
SUBPOBLACIONES B.....	120
1.1. Desarrollo de un protocolo simplificado de citometría de alta	
sensibilidad.....	120
1.2. Desarrollo de un sistema que evalúa el grado de hemodilución de	
una muestra de médula ósea.....	122
1.3. Panel de marcadores para el análisis de linfocitos B.....	124
2. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES B EN EL SEGUIMIENTO DE	
ENFERMEDADES AUTOINMUNES TRATADAS CON RITUXIMAB.....	131
2.1. Patrón de reconstitución B tras la administración de Rituximab ...	131
2.2. Subpoblaciones B persistentes tras tratamiento con Rituximab ...	134
2.3. Cuándo realizar la monitorización por citometría del tratamiento con	
Rituximab.....	140
2.4. Nivel de sensibilidad de la citometría de flujo para monitorización del	
tratamiento con Rituximab.....	141

CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	145
ABREVIATURAS	159
ANEXO	163

Introducción

1. ANÁLISIS DE LINFOCITOS B POR CITOMETRÍA PARA MONITORIZACIÓN DE TRATAMIENTO CON RITUXIMAB EN PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los linfocitos B (LB) tienen un papel patogénico importante en numerosas enfermedades autoinmunes, sin embargo, el conocimiento sobre cómo contribuyen a la aparición, patogénesis y actividad de la enfermedad, es aún muy escaso (Dorner 2006). Los últimos avances terapéuticos e investigaciones se centran en la eficacia de las terapias de depleción de células B, especialmente mediante el uso de Rituximab (Rx). Estos ensayos proporcionan una oportunidad única para examinar la influencia de la depleción sobre las subpoblaciones B, establecer la dinámica de repoblación y determinar su relación con la clínica (Jackson et al. 2008).

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (humano/murino) anti-CD20 cuya incorporación al tratamiento habitual de los linfomas B supuso una mejoría espectacular en el pronóstico de este tipo de neoplasias (Cvetkovic y Perry 2006). En los últimos años se ha iniciado su uso en enfermedades autoinmunes con muy buenos resultados, especialmente en aquellas enfermedades donde el daño está mediado por autoanticuerpos, como es el caso del Pénfigo vulgar (PV), la Artritis Reumatoide (AR) o el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Gurcan et al. 2009; Lim et al. 2010). La unión entre el Rx y el CD20 en la superficie celular, induce la eliminación de los linfocitos B mediante distintos mecanismos (Figura 1) (Boross y Leusen 2012; Gurcan et al. 2009).

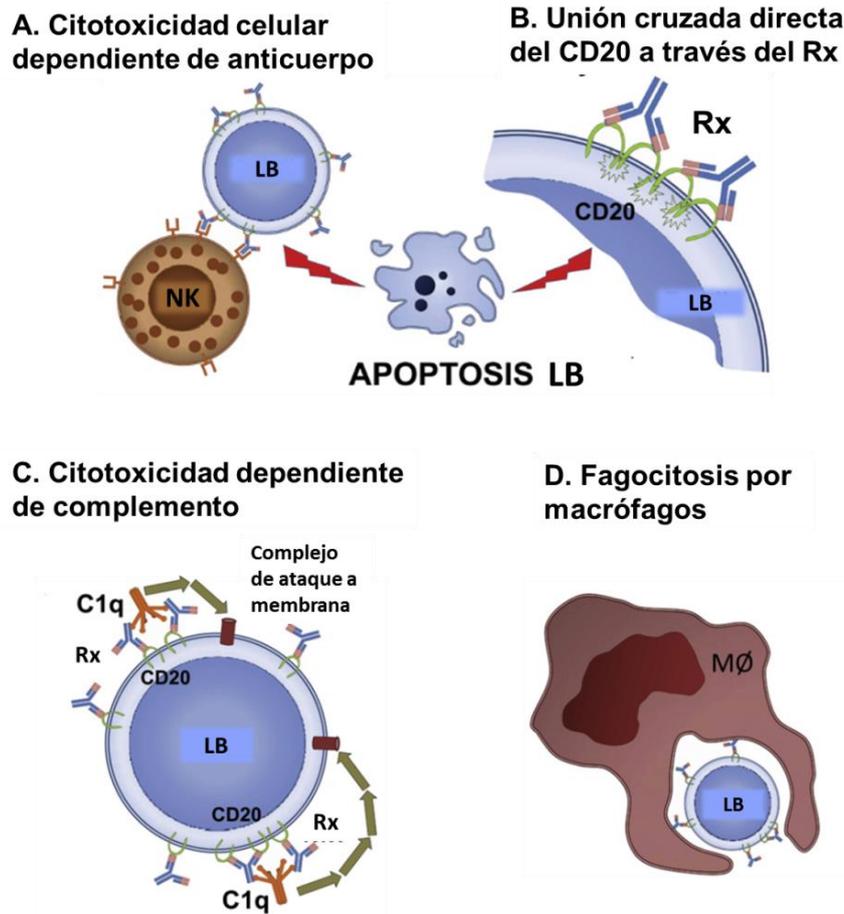


Figura 1: Mecanismos de depleción de linfocitos B inducidos por Rituximab. (A) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK. (B) Inducción de apoptosis del linfocito B por unión cruzada de moléculas CD20 a cargo del Rituximab. (C) Citotoxicidad dependiente de complemento. (D) Opsonización y posterior fagocitosis por células del sistema retículo-endotelial como monocitos o macrófagos.

La hipótesis aceptada es que la intensa depleción producida por el Rx conlleva la eliminación de LB de memoria autorreactivos, tanto en sangre periférica (SP) como en tejidos linfoides secundarios. El descenso de LB memoria implica a su vez una reducción del título de autoanticuerpos y por tanto una mejoría clínica. Sin embargo aunque su eficacia en general es significativa, existe una gran variabilidad en la respuesta de los pacientes, abriendo múltiples incógnitas acerca de la intensidad y duración de la respuesta clínica (Kasperkiewicz et al. 2012; Thurlings et al. 2010).

Existen numerosas investigaciones que describen los factores relacionados con la respuesta a Rx, como es el grado o intensidad de la depleción B tras la

administración de Rx. Las publicaciones más relevantes a este respecto son las realizadas por el grupo de Vital et al. tanto en pacientes diagnosticados de AR como LES. En ellas se demostró que tras el primer ciclo de Rx, los pacientes sin respuesta presentaban una depleción B incompleta, donde predominan células con fenotipo pre-plasmático. También demostraron que en la respuesta clínica, el grado de depleción es más importante que el tipo de dosis administrada (Vital et al. 2010; Vital, Dass, et al. 2011; Vital, Rawstron, et al. 2011). En pacientes con AR resistente a agentes anti-TNF, Dass et al. observó que a los 6 meses de la primera infusión de Rx se podían detectar LB en SP en el 63% de los casos, y que estos pacientes presentaban una clínica peor que los pacientes sin LB en el mismo periodo de tiempo (Dass et al. 2008). En ese mismo año, en pacientes con PV se demostró que la depleción B inducida durante los 6 primeros meses se relaciona con el descenso de autoanticuerpos anti-desmogleína 3, y por lo tanto con el curso evolutivo de la enfermedad (Eming et al. 2008).

Otros estudios han demostrado que la eliminación de LB no debe ser estudiada como un todo. En pacientes con AR Nakou et al. reveló que la depleción afectaba principalmente a LB activados y que la respuesta estaba asociada a la desaparición en SP y médula ósea (MO) de células B de memoria CD27⁺ (Nakou et al. 2009). De manera similar Sellam et al. encontró frecuencias significativamente reducidas de LB memoria CD27⁺ en SP de pacientes con AR tratados con Rx, siendo predictiva de la respuesta a Rx (Sellam et al. 2011b). Es decir, no todas las subpoblaciones de LB tienen la misma sensibilidad al Rx, siendo además los LB autorreactivos los más sensibles a las terapias de depleción (Cambridge et al. 2006).

Otro de los factores más relevantes en las respuestas post-Rx es la reconstitución de los LB. La eliminación casi total de linfocitos B en sangre periférica persiste entre 5 y 12 meses, seguido de un proceso de repoblación que suele iniciarse con la aparición en sangre de linfocitos B inmaduros y vírgenes. La reaparición de LB de memoria tiende a retasarse por periodos prolongados, de incluso 2 años (Dass et al. 2008; Leandro 2013; Vital, Rawstron, et al. 2011). En pacientes con LES Anolik et al. observó una respuesta mantenida en el tiempo en aquellos pacientes donde la

reconstitución de células B de memoria en SP se había retrasado durante varios años. Esta ausencia de LB memoria CD27⁺ correlacionaba con la ausencia de autoanticuerpos, es decir, la aparición temprana de LB memoria en sangre se relaciona con recaídas precoces (Anolik, Barnard, et al. 2007). De manera similar Lazarus et al. demostró que la recaída temprana de pacientes con LES estaba asociada a una tasa de repoblación más rápida. Además encontraron que las recaídas con altos niveles de anticuerpos anti-dsDNA presentaban un mayor porcentaje de plasmablastos, mientras que las recaídas con niveles bajos de autoanticuerpos se acompañaba de células con fenotipo de célula B virgen (Lazarus et al. 2012). Por tanto, el tipo de reconstitución B es otro factor relevante en los estudios post-Rx. Sin embargo, en estos pacientes cabe plantearse que no se trate en realidad de una repoblación generada a partir de células vírgenes, sino que los pacientes que recaen precozmente son aquellos que no deplecionaron suficientemente. Es decir, persiste un número mínimo de LB memoria en los órganos linfoides secundarios, que al encontrarse en un entorno linfopénico, se expanden por un mecanismo de proliferación homeostática y conducen a la recaída de la enfermedad (Nakou et al. 2009).

Además de los estudios anteriormente descritos, existen investigaciones que no encuentran una clara relación entre la respuesta clínica y la intensidad de depleción y/o el patrón de reconstitución B (Breedveld et al. 2007; Brezinschek et al. 2012; Kasperkiewicz et al. 2012). Y es que, además de la gran variabilidad demostrada en los pacientes tanto en diagnósticos como en tratamientos hay que sumar que el análisis de LB post-Rx requiere de un exhaustivo estudio de subpoblaciones y de la adquisición de un elevado número de leucocitos, ya que se encuentran en situación de depleción B.

La existencia de estos datos contradictorios en la literatura, hacen que por el momento no se monitorice la repoblación post-Rx en el ámbito clínico, decidiéndose empíricamente la pauta de administración del fármaco en función de criterios clínicos (Martin Mola et al. 2011). Teniendo en cuenta el coste del Rx, así como sus posibles efectos secundarios, sería deseable contar con un sistema que intentara objetivar el efecto del fármaco en cada paciente, para así ajustar mejor la pauta terapéutica.

Es posible que la aplicación de técnicas de citometría de flujo ultrasensible junto con el estudio exhaustivo de subpoblaciones B mediante citometría multicolor de 8 fluorescencias, permita detectar en sangre periférica poblaciones mínimas residuales que permanecen indetectables con las técnicas utilizadas hasta el momento (Tabla 1). Esto supondría un avance significativo a la hora de monitorizar las características de la repoblación B post-Rituximab en enfermedades autoinmunes y así identificar diferencias entre pacientes que hasta ahora pasaban desapercibidas.

Tabla 1: Datos técnicos de estudios que analizan subpoblaciones B tras tratamiento con Rituximab

Referencia	Nº de fluorescencias estudiadas simultáneamente	Nº de eventos adquiridos
Anolik et al. 2007	4	No especificado
Breedveld et al. 2007	4	No especificado
Dass et al. 2008	6	500,000
Nakou et al. 2009	2	200,000
Vital et al. 2010; Vital, Dass, et al. 2011; Vital, Rawstron, et al. 2011	6	500,000
Sellam et al. 2011	4	No especificado
Brezinschek et al. 2012	8	500,000
Lazarus et al. 2012	3	No especificado

2. CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALTA SENSIBILIDAD

Los principales factores que determinan la sensibilidad de la citometría de flujo son el número de células diana detectadas y el número de células totales analizadas. Aplicado a los estudios de caracterización B, ambos factores son el número de linfocitos B necesario para un análisis fiable de su composición y el número de leucocitos totales adquiridos.

En un plano teórico se acepta que es necesario detectar un mínimo de 100 células diana para que la cuantificación por citometría de alta sensibilidad sea precisa. Esto se basa en los estudios realizados en neoplasias hematológicas para la cuantificación de enfermedad mínima residual (EMR), donde las células tumorales residuales son consideradas eventos raros por lo que, teóricamente, siguen una distribución de Poisson (Rawstron et al. 2008; Stetler-Stevenson et al. 2007; Yuan and Stetler-Stevenson 2011). En esta distribución el coeficiente de variación (CV) es igual a $100/\sqrt{n}$, siendo “n” el número de eventos del *cluster* tumoral. De modo que un *cluster* de 100 eventos tendrá un CV del 10%, lo que se considera una precisión adecuada (Harvey Motulsky 2010).

Sin embargo en la práctica existen numerosos trabajos que reducen a 50 el número mínimo de células tumorales (Craig and Foon 2008; Rawstron et al. 2007; Wilson et al. 2010) e incluso a tan solo 20 (Ritgen et al. 2008), 15 (Thorn et al. 2009) o 10 (Stark et al. 2009) células tumorales, donde en ningún caso se determina el efecto sobre la precisión del análisis. En 2010 Domingo et al. realizó un estudio para determinar cuál es realmente el tamaño mínimo que debe tener un *cluster* para que su cuantificación en citometría de alta sensibilidad sea precisa. En él se analizaron CV para tamaños de *cluster* de aproximadamente 20, 50 y 100 eventos en varios tipos de neoplasias hematológicas. Demostraron que con la adquisición de al menos 50-60 células diana se obtenía una precisión adecuada con un CV menor al 15%. También observaron que este número podría reducirse a 20 sin una pérdida significativa de precisión en aquellos casos cuyas células diana presenten un fenotipo específico que las identifique en espacios vacíos libres de eventos de fondo (Domingo et al. 2010).

El límite de detección en citometría de flujo estándar es de 10^{-4} , es decir, detectar 1 célula diana en 10,000. Tal y como se ha definido anteriormente, si el número mínimo de células diana es de entre 20 y 50, entonces es necesario adquirir entre 200,000 y 500.000 leucocitos totales. Por lo tanto para mejorar la sensibilidad de la citometría en un logaritmo (de 10^{-4} a 10^{-5}) se necesita analizar 10 veces más de leucocitos, es decir, 2 millones y 5 millones respectivamente (Figura 2).

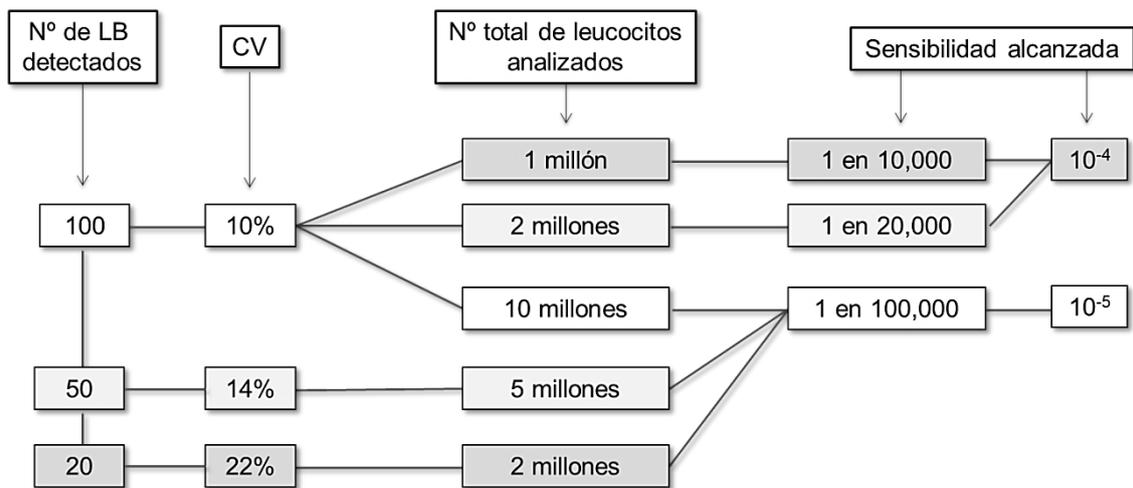


Figura 2: Relación entre número de linfocitos B detectados, número total de leucocitos adquiridos y sensibilidad alcanzada en citometría de flujo.

Las estrategias clásicas para aumentar el número de leucocitos adquiridos están basadas en el enriquecimiento celular de las muestras, ya sea mediante la centrifugación en gradientes de densidad o mediante separaciones inmunomagnéticas de células B. Pero estas técnicas no son recomendables, ya que los resultados no se pueden referir al total de leucocitos, pueden afectar a la expresión de antígenos de superficie y provocar pérdidas selectivas de determinadas subpoblaciones (Bene and Kaeda 2009; Rawstron et al. 2008; Romeu et al. 1992; Tamul et al. 1995; Yuan and Stetler-Stevenson 2011).

Actualmente gracias al desarrollo informático es posible generar y analizar ficheros de hasta 10 millones de células. En la técnica de citometría de alta sensibilidad que hemos desarrollado (Domingo et al. 2010) se analizan 10 veces más de leucocitos. Para ello se adquieren conjuntamente varios tubos

independientes en un único fichero, marcados con la misma combinación de anticuerpos monoclonales, a razón de 2 millones de células por tubo. De este modo, el número total de células adquiridas puede aumentar de forma muy significativa manteniéndose la calidad de la adquisición, la intensidad de fluorescencia y la composición celular con respecto a los ficheros que proceden de la adquisición de un solo tubo.

Pero esta estrategia plantea dos dificultades que pueden convertirse en una importante limitación a la hora de implementar la técnica en la práctica cotidiana:

- 1) El tiempo de adquisición de la muestra aumenta en función del nº de leucocitos analizados. Actualmente una velocidad de 4000 eventos/seg está aceptada como la velocidad óptima en la que la tasa de abortos electrónicos no afecta al conjunto de células analizadas (Domingo et al. 2010). Pero a esta velocidad la adquisición de 10 millones de eventos supone un coste en tiempo de alrededor 41 minutos. Incrementando el flujo de adquisición del citómetro, medido en $\mu\text{L}/\text{min}$, aumentaría el nº de eventos adquiridos por segundo, reduciendo considerablemente el tiempo de adquisición. Sin embargo sería necesario identificar cuál es su efecto en el número de abortos electrónicos y determinar el máximo flujo que es capaz de tolerar el citómetro.
- 2) El coste se multiplica tantas veces como nº de marcajes individuales sean necesarios para cada combinación de marcadores. Es decir, para marcar 10 millones de leucocitos se necesitan 5 tubos y por lo tanto el coste de la técnica se multiplica por 5. Para reducir este número es preciso marcar más de 2 millones de células en cada tubo. Debido a que las concentraciones de marcaje de los anticuerpos monoclonales se encuentran en situación de saturación, sería posible realizar un estudio para determinar la concentración máxima de células para las que el marcaje no se ve comprometido y así reducir el coste final de la técnica.

3. PANEL DE MARCADORES PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL COMPARTIMENTO B

En las dos últimas décadas se ha descubierto un gran número de subpoblaciones de linfocitos B. Desde la clasificación *Bm* realizada en 1994 (V. Pascual et al. 1994), se ha comprobado que las fracciones establecidas por este sistema son mucho más heterogéneas de lo que en un principio se pensó. Desde esa fecha se han descrito numerosos marcadores que mejoran la discriminación entre subpoblaciones B, donde el CD19, CD38, IgD, IgM, CD27 y CD24 se han consolidado en numerosos trabajos como la espina dorsal de cualquier panel desarrollado para el estudio de LB (Tabla 2).

Tabla 2: Marcadores considerados principales para el análisis de subpoblaciones de linfocitos B

Marcador	Principal utilidad	Observaciones	Referencias
CD19	Selección del conjunto de LB	Ampliamente utilizado ya que se expresa de manera constante durante todo el desarrollo B	Jackson et al. 2008; LeBien y Tedder 2008; Maecker, McCoy, y Nussenblatt 2012; Murphy, Travers, and Walport 2009; Perez-Andres et al. 2010
CD38	Alta expresión en células plasmáticas, plasmablastos, centro germinal y estadios inmaduros	Su expresión diferencial le hace de especial utilidad en combinación con otros marcadores (estrategia <i>Bm</i> o CD38/CD24)	Bemark et al. 2012; Perez-Andres et al. 2010; Victora and Nussenzweig 2012; Yoshida et al. 2010
IgD IgM	Identificación y diferenciación de LB con (IgD/IgM ⁺) y sin (IgD ⁻ /IgM ⁺) cambio de isotipo	La inclusión de IgM fue a posteriori, demostró ser de gran utilidad para identificar LB inmaduros y diferenciar subpoblaciones sin cambio de clase con intensidades variables de IgM	Agrawal et al. 2013; Bemark et al. 2012; Berkowska et al. 2011; Seifert y Kuppers 2009; Weill, Weller, y Reynaud 2009
CD27	Selección de LB memoria	Aunque se han propuesto numerosas alternativas como el CD45RB ^{MEM55} , CD330a o el transportador ABCB1, ninguna ha demostrado mayor especificidad que el CD27 como marcador B de memoria	Agematsu et al. 1997; Cooper 1987; Fecteau, Cote, y Neron 2006; Jackson et al. 2008; Klein, Rajewsky, y Kuppers 1998; Lanzavecchia y Sallusto 2009; Wirths y Lanzavecchia 2005; Wu, Kipling, y Dunn-Walters 2011
CD24	Identificación y diferenciación de LB transicionales y otros estadios inmaduros	Junto con el CD38 representa una de las principales estrategias de diferenciación B, su combinación permite diferenciar numerosas facciones de LB	Buffa et al. 2013; Carsetti, Rosado, y Wardmann 2004; Cuss et al. 2006; Marie-Cardine et al. 2008; Palanichamy et al. 2009

Como podemos ver no solo son importantes los marcadores introducidos individualmente, sino también las estrategias definidas por sus combinaciones. Un ejemplo de ello fue la clasificación *Bm*, donde se podían identificar hasta 5 subpoblaciones diferentes (Bm1-Bm5) enfrentando IgD vs CD38 (Liu y Arpin 1997). Más recientemente encontramos la estrategia IgD/IgM para la identificación de LB con cambio de isotipo y estadios inmaduros (Agrawal et al. 2013; Berkowska et al. 2011) o la estrategia CD38/CD24, actualmente considerada como una de las más relevantes. Esta estrategia fue inicialmente orientada hacia la identificación de LB transicionales e inmaduros CD38⁺⁺, CD24⁺⁺ (Carsetti, Rosado, y Wardmann 2004; Marie-Cardine et al. 2008), sin embargo con el tiempo numerosas investigaciones han demostrado que este sencillo diagrama biparamétrico puede identificar fracciones muy específicas y distintas dentro de los LB (Figura 3) (Buffa et al. 2013; Cuss et al. 2006; Palanichamy et al. 2009).

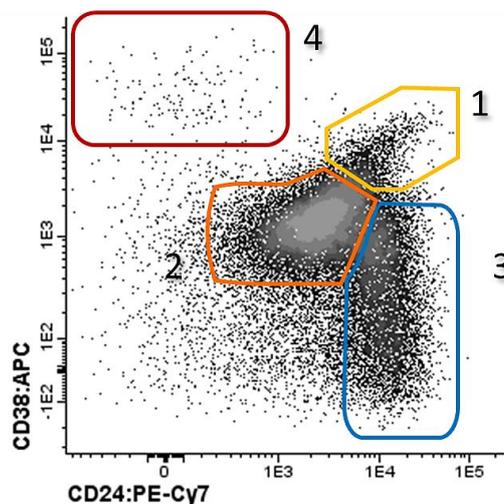


Figura 3: Clasificación de linfocitos B en función de la estrategia CD38/CD24. Región 1, LB inmaduros y transicionales. Región 2, LB vírgenes. Región 3, LB memoria. Región 4, células plasmáticas y células de centro germinal de órganos linfoides.

Pero además de estos seis marcadores básicos, se ha demostrado que es imprescindible la inclusión de marcadores de exclusión como es el CD3. Se trata de un marcador especialmente relevante a la hora de descartar dobletes de linfocitos T y B tanto en muestras de tejido linfoide como en muestras con un elevado número de eventos adquiridos. De esta forma evitamos errores en la identificación de subpoblaciones (Descatoire et al. 2011) e incrementamos la precisión del análisis.

Por lo tanto en una combinación de 8 colores esto nos deja con una posición libre para el estudio de otros marcadores potencialmente útiles en la identificación de subpoblaciones B como son:

CD21: Receptor del complemento tipo 2 (CR2 o CD21). En LB, el CD21 forma un complejo junto con CD19 y CD81 (TAPA-1), que funciona como un correceptor de BCR favoreciendo la activación celular (Fearon 1993; Fearon y Carter 1995). Su expresión varía en función de la etapa de maduración, inicialmente en las células precursoras es negativo, su expresión aumenta gradualmente dentro de las células transicionales hasta hacerse completamente positivo en células vírgenes, finalmente se reduce en células plasmáticas y plasmablastos. Gracias a este patrón el CD21 incrementa la especificidad en el análisis tanto de células transicionales (Marie-Cardine et al. 2008; Palanichamy et al. 2009; Suryani et al. 2010) como de células plasmáticas y plasmablastos (Isaak et al. 2006). Además en el conjunto de células B maduras permite identificar células CD21^{-/low} consideradas anérgicas, muy relevantes en situaciones patológicas como inmunodeficiencias o enfermedades autoinmunes (Charles et al. 2011; Saadoun et al. 2013).

CD1c: Es una de las cinco isoformas CD1 de seres humanos (CD1a-e), implicada en la presentación de antígenos de glucolípidos (Fox et al. 2013). Su relevancia en el estudio de LB está directamente relacionada con la fracción de células circulantes con mutaciones somáticas IgM⁺, IgD⁺, CD27⁺. Inicialmente estas células fueron consideradas como células de memoria IgM, pero estudios posteriores indicaron que podrían representar una población distinta relacionada con la zona marginal del bazo (Lanzavecchia y Sallusto 2009). Su estudio es complejo, ya que la zona marginal humana es única y diferente a

todos modelos animales estudiados hasta el momento (Lanzavecchia y Sallusto 2009; Steiniger et al. 2005). Investigaciones recientes han descubierto una alta expresión de CD1c en los LB de la zona marginal en cortes histológicos de bazo (Weller et al. 2008). Por ello se ha propuesto como un potencial marcador específico de células circulantes equivalentes a la zona marginal B humana (Cerutti, Cols, y Puga 2013; Sanz et al. 2008; Weill, Weller, y Reynaud 2009; Weller et al. 2004).

CD10: Endopeptidasa neutra de la familia de las metaloproteinasas dependientes de zinc, se expresa en numerosos tejidos y es capaz de degradar péptidos y citoquinas (McIntosh et al. 1999; Shipp y Look 1993). Fisiológicamente el CD10 se expresa en los estadios más inmaduros de linfocitos B, reduciendo su expresión hasta hacerse completamente negativa en las células vírgenes (Agrawal et al. 2013; Palanichamy et al. 2009). Durante los procesos de formación de folículos secundarios se observa un incremento de su expresión y por ello está considerado como uno de los marcadores más relevantes a la hora de identificar células del centro germinal (Perez-Andres et al. 2010).

CD23: Es el receptor de baja afinidad de la IgE (FcεRII), juega un papel muy importante en la unión y presentación de complejos Ag/IgE (Acharya et al. 2010). Ha sido un marcador ampliamente utilizado en citometría de flujo para la caracterización de linfocitos B apareciendo incluso en las primeras clasificaciones del sistema Bm (V. Pascual et al. 1994). Aunque se sabe que su expresión no es completa, se le considera un buen marcador para identificar y diferenciar células vírgenes del resto de células, siendo además completamente negativo para LB de memoria (Perez-Andres et al. 2010).

JAM-C: También conocido como JAM3, es una molécula de adhesión perteneciente a la familia de inmunoglobulinas que interacciona con JAM-B u otra molécula JAM-C. Está implicada en el “*homing*” celular hacia diferentes tejidos, especialmente relevante en el reclutamiento de leucocitos hacia lugares de inflamación (Donate et al. 2013; Manetti et al. 2013). Se ha demostrado que está directamente relacionada con el desarrollo B. Inicialmente en las células inmaduras es negativo, su expresión aumenta progresivamente hasta hacerse completamente positivo en las células vírgenes, para después desaparecer en

las células del centro germinal. Teóricamente esta característica permitiría diferenciar las células de memoria CD27⁺ y JAM-C⁺⁺ de las células del centro germinal y células plasmáticas JAM-C⁻ (Manetti et al. 2013; Ody et al. 2007).

B220: También conocido como CD45R es una glicoproteína perteneciente a la familia de tirosín fosfatasas. Se ha demostrado que su expresión se correlaciona inversamente con la expresión de CD27. Teóricamente gracias a esta característica sería muy útil a la hora de diferenciar células vírgenes y células B de memoria, lo que la convierte en una opción interesante en la caracterización de linfocitos B (Bleesing y Fleisher 2003).

Además de lo anterior también es importante el tipo de estudio que se va a realizar y el tejido o tejidos que se analizan. A continuación se describen las características de los trabajos más relevantes a este respecto (Tabla 3). En ella podemos observar que los estadios tempranos de LB se estudian principalmente en tejido linfoide primario como la médula ósea o el cordón umbilical, mientras que los estadios de memoria junto con el centro germinal se estudian en tejidos linfoides secundarios como el bazo, ganglios o amígdalas, siendo la sangre el principal vehículo de transporte donde podemos encontrar cualquier subclase representada.

Tal y como se menciona en el apartado 1 de la introducción en los estudios post-Rx el tipo de reconstitución B en sangre es un factor muy importante. En estos pacientes la repoblación B puede ser generada en órganos linfoides primarios a partir del desarrollo de las células vírgenes o a partir de células resistentes en los órganos linfoides secundarios (Nakou et al. 2009). Por lo tanto, a la hora de definir una combinación de 8 colores específica para el análisis de muestras de sangre post-Rx, además de la sangre, sería necesario realizar un estudio previo que incluya diferentes tejidos para definir completamente el conjunto de las subpoblaciones B.

Tabla 3: Estudios principales de subpoblaciones de linfocitos B

Referencia	Paneles definidos	Subpoblaciones de LB estudiadas	Tejidos analizados
Wehr et al. 2004	Combinaciones de 4 colores incluyendo CD19, CD38, IgM, IgD, IgG, CD27, CD21, CD10, junto con otros marcadores de activación	Transicionales, vírgenes, memoria con y sin cambio de clase, anérgicas y plasmablastos	Sangre
Fecteau, Cote, y Neron 2006	Combinaciones de 4 colores incluyendo CD19, CD38, IgM, IgD, IgG, CD27, B220 y CD5	Vírgenes, memoria con y sin cambio de clase, memoria CD27 ⁺ y plasmablastos	Sangre
Palanichamy et al. 2009	Combinaciones de 4 colores incluyendo CD19, CD38, CD24, IgM, IgD, CD27, CD10 y ABCB1.	Inmaduras, transicionales vírgenes, centro germinal y memoria con y sin cambio de clase	Cordón umbilical Médula ósea Sangre Bazo Amígdala
Kjeldsen et al. 2011	1 tubo de 8 colores CD3_CXCR4_CD44_CD10_CD27_CD38_CD20_CD45	Vírgenes, centro germinal, memoria y plasmablastos	Amígdala
Berkowska et al. 2011	Combinaciones de 6 colores en células CD19+ aisladas: CD38, CD24, CD27, IgM, IgD, IgA junto con otros marcadores de activación	Vírgenes, centro germinal, memoria con y sin cambio de clase	Sangre Amígdala Colon
Colombo et al. 2013	Combinaciones de 6 colores incluyendo CD19, CD38, CD24, CD27, IgM, IgD, IgA, CD21, CD1c, CD23, CD22, junto con otros marcadores de activación	Vírgenes, centro germinal, memoria con y sin cambio de clase y plasmablastos	Bazo Amígdala
Agrawal et al. 2013	2 tubos de 8 colores CD24_CD38_IgD_CD10_CD19_CD27_IgM_CD45 CD5_CD21_IgD_CD10_CD19_CD27_IgM_CD45	Precursoras, inmaduras, transicionales, vírgenes y memoria con cambio de clase	Médula ósea

Sin embargo con este planteamiento existe una dificultad añadida, y es que a la hora de analizar muestras de médula ósea por citometría, la hemodilución de las mismas es un factor clave. Durante el proceso de punción, se realizan dos o más tomas sucesivas de muestra. La primera de ellas es la más representativa y de mayor calidad, y se destina para estudios morfológicos. Las muestras recogidas posteriormente quedan inevitablemente diluidas con una cierta cantidad de SP y son las que se utilizarán en los análisis por citometría de flujo. Esta es una de las razones por la que los porcentajes celulares de MO en morfología son diferentes a los estudiados por citometría de flujo (Rawstron et al. 2008; Smock, Perkins, y Bahler 2007).

Aunque es inevitable la presencia de una cierta cantidad de SP, existe un límite en el que la muestra obtenida deja de ser representativa de la MO. Es fácil identificar muestras de muy mala calidad, que corresponden casi íntegramente a SP, no sólo por morfología, denominado comúnmente como punción blanca, sino también por citometría, donde no se detectan las poblaciones propias de una MO. Sin embargo, mucho más complicado es detectar muestras con un cierto grado de hemodilución algo muy importante en las aplicaciones cuantitativas de la citometría de flujo, como por ejemplo, el estudio de EMR o el estudio de subpoblaciones leucocitarias minoritarias, donde la contaminación con SP puede infraestimar considerablemente los resultados finales (Brooimans et al. 2009; Gupta et al. 2009; Rawstron et al. 2008).

La contaminación con SP en muestras de MO no es algo que se evalúe de manera rutinaria en los laboratorios, las guías de citometría que tratan este problema se limitan a recomendar un análisis morfológico de la muestra de MO (Brando et al. 2000; Johansson et al. 2014) mientras que otras no hacen recomendaciones a este respecto (Davis et al. 2013; Kalina et al. 2012; Stetler-Stevenson et al. 2007). Un sistema que estime el nivel de contaminación con SP sería de gran ayuda, para ser conscientes del grado de contaminación con SP. En la literatura existen pocos autores que traten este tema de manera específica. Holdrinet en 1980 establece un método a través del cual obtiene valor de contaminación relacionando los parámetros de hemoglobina y de cantidad de células nucleadas tanto en sangre como en MO (Holdrinet et al. 1980). En nuestro conocimiento se trata del único método cuantitativo descrito en la literatura y que además ha sido utilizado por otros autores (Brooimans et al. 2009). La limitación de este método radica en la necesidad de obtener una muestra pareada de SP junto con la muestra de MO, situación que no siempre es posible. Otros autores proponen normalizar los resultados para el estudio de una determinada población patológica en MO, ya sea a través de los precursores de MO (Frébet et al. 2011) o a través de los neutrófilos maduros presentes en la muestra de MO (Loken et al. 2009). Pero la normalización de resultados no es un método extendido en citometría diagnóstica ya que solo es aplicable a la patología de estudio en concreto. Dada la importancia a la hora

de establecer valores de referencia en MO (Brooimans et al. 2009) la evaluación de la calidad de las muestras de MO es imprescindible.

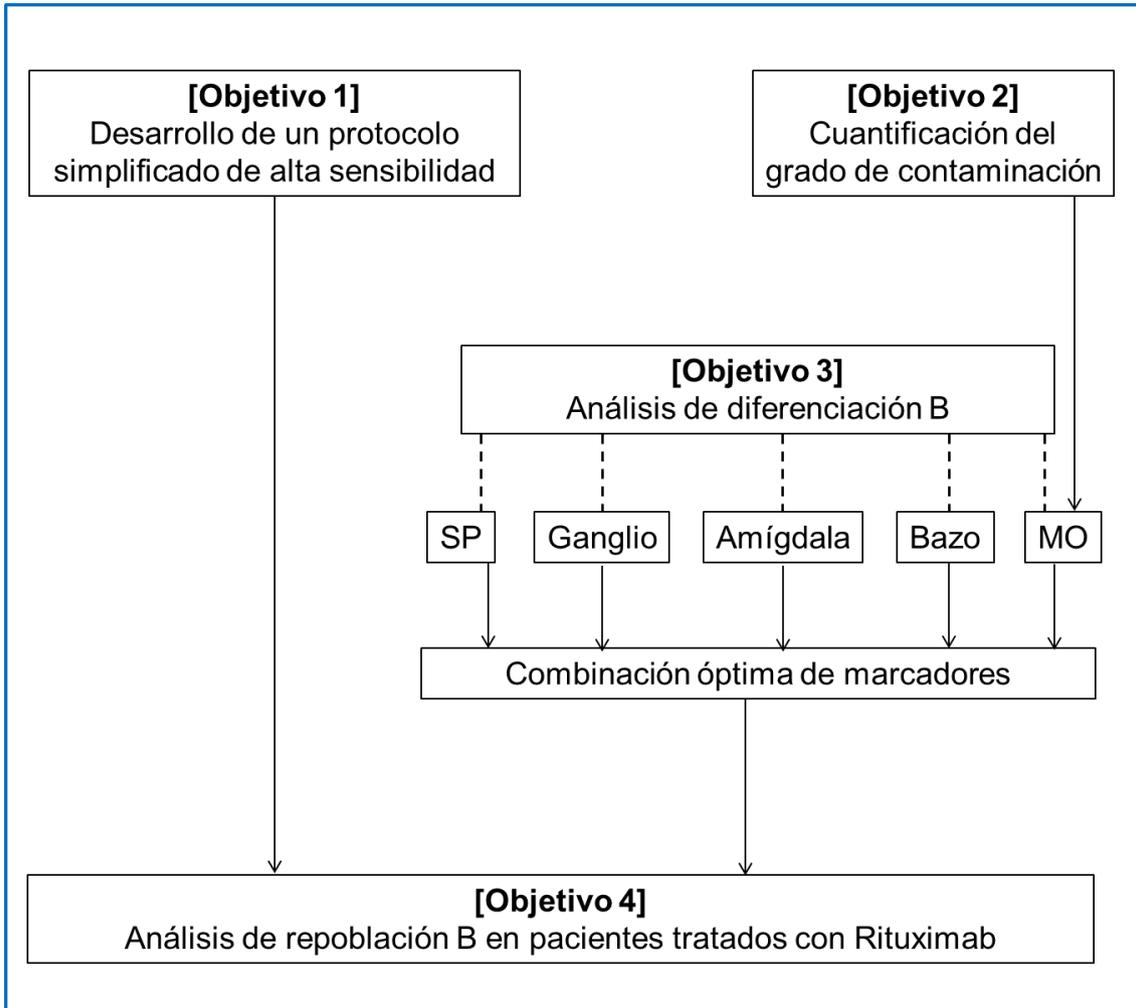
Planteamiento del Trabajo

1. HIPÓTESIS

La aplicación de técnicas de citometría de flujo ultrasensible, junto con el estudio exhaustivo de subpoblaciones B, permitirá detectar en sangre periférica poblaciones mínimas que permanecen indetectables con las técnicas utilizadas hasta el momento. Esto podría suponer un avance significativo a la hora de monitorizar las características de la repoblación B post-Rituximab en enfermedades autoinmunes, identificando diferencias entre pacientes que hasta ahora pasan desapercibidas.

2. OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un protocolo simplificado de citometría de alta sensibilidad, que permita superar las limitaciones de tiempo y coste planteadas en los protocolos actuales.
- 2) Desarrollar un sistema de cuantificación del grado de contaminación de una muestra de médula ósea con sangre periférica, con el fin de identificar muestras de buena calidad con las que realizar el análisis de subpoblaciones B.
- 3) Establecer una combinación de marcadores que garantice una adecuada caracterización de subpoblaciones B a lo largo de todo el proceso de diferenciación.
- 4) Analizar la distribución de subpoblaciones B en sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con Rituximab a lo largo de las sucesivas etapas de repoblación, con el fin de establecer los requerimientos técnicos para una adecuada monitorización del tratamiento.



Material y Métodos

1. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados se detallan en la Tabla 4. Se utilizó en todos los casos la concentración recomendada por el fabricante.

Tabla 4: Lista de anticuerpos monoclonales utilizados

Anticuerpo monoclonal	Fluorocromo	Fabricante	Clon
Anti-CD38	FITC	Pharmingen,BD	HIT2
Anti-IgD	FITC	Invitrogen	Policlonal
Anti-CD1c	PE	MB	AD5-8E7
Anti-CD10	PE	BD	HI10a
Anti-CD21	PE	BD	B-ly4
Anti-CD23	PE	BD	EBVCS-5
Anti-CD34	PE	BD	8G12
Anti-CD44	PE	BD	G44-26
Anti-B220	PE	Pharmingen,BD	RA3-6B2
Anti-JAMC	PE	Biolegend	SHM33
Anti-CD3	PerCP-Cy5.5	BD	SK7
Anti-CD19	PerCP-Cy5.5	BD	SJ25C1
Anti-CD138	PerCP-Cy5.5	BD	MI15
Anti-CD19	PE-Cy7	BD	SJ25C1
Anti-CD24	PE-Cy7	Pharmingen,BD	ML5
Anti-CD4	APC	BD	SK3
Anti-CD10	APC	BD	HI10a
Anti-CD38	APC	BD	HB-7
Anti-CD3	APC-H7	BD	SK7
Anti-CD20	APC-H7	BD	L27
Anti-CD45	APC-H7	BD	2D1
Anti-CD27	BV421	Biolegend	O323
Anti-IgM	BV510	Biolegend	MHM-88

APC, alofocianina. APC-H7, alofocianina análogo de cianina 7. BD, Becton-Dickinson. BV, brillante violet. FITC, fluorescein-isotiocianato. MB, Miltenyi Biotec. PE, ficoeritrina. PerCP-Cy5.5, proteína peridinin clorofila-cianina 5. PE-Cy7, ficoeritrina-cianina 7.

2. CONFIGURACIÓN DEL CITÓMETRO

Se ha utilizado un citómetro digital FACSCanto™II (BD) de 8 colores (ocho fotomultiplicadores en una configuración estándar 4-2-2) con tres láseres acoplados. El instrumento no fue alterado y todos los filtros son originales. La configuración detallada del mismo se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Configuración del citómetro digital FACSCanto™II

Láser (λ)	Tipo de detector	Tipo de filtro	Fluorocromos utilizados (λ máxima de emisión)
Azul (488 nm)	FSC-Fotodiodo	488/10 BP	-
	SSC-PMT	488/10 BP	-
	FL1-PMT	530/30 BP	FITC (520 nm)
	FL2-PMT	585/42 BP	PE (575 nm)
	FL3-PMT	670 LP	PerCP.Cy5.5 (695 nm)
	FL4-PMT	780/60 BP	PE.Cy7 (785 nm)
Rojo (633 nm)	FL5-PMT	660/20 BP	APC (660 nm)
	FL6-PMT	780/60 BP	APC.H7 (785 nm)
Violeta (405 nm)	FL7-PMT	450/50 BP	BV421 (421 nm)
	FL8-PMT	510/50 BP	BV510 (510 nm)

APC, alofocianina. APC-H7, alofocianina análogo de cianina 7. BP, “*band-pass*” o tipo paso de banda. BV, brillant violet. FITC, fluorescein-isotiocianato. FSC, “*forward scatter*” o tamaño celular. LP, “*long-pass*” o tipo paso largo. PE, ficoeritrina. PerCP-Cy5.5, proteína peridinin clorofila-cianina 5. PE-Cy7, ficoeritrina-cianina 7. PMT, fotomultiplicador. λ, longitud de onda.

2.1. Calibración y compensación

Los voltajes se eligieron mediante el protocolo de Perfetto (Perfetto et al. 2006) utilizando en cada detector microesferas Rainbow de 8 picos (Spherotech, BD) y CompBeads sin marcar (BD). De cada PMT se eligió el voltaje mínimo con el que se conseguía la máxima separación señal-ruido y el mínimo CV, dentro del rango de linealidad de cada detector.

Tabla 6: Voltajes establecidos según el método Perfetto

Detector	Voltaje (V)	Amplificación	Parámetro
FSC	≈ 300	Lineal	FSC-Área
SSC	≈ 405	Lineal	SSC-Área
FL1	458	Logarítmica	FL1-Área
FL2	452	Logarítmica	FL2-Área
FL3	642	Logarítmica	FL3-Área
FL4	701	Logarítmica	FL4-Área
FL5	610	Logarítmica	FL5-Área
FL6	522	Logarítmica	FL6-Área
FL7	379	Logarítmica	FL7-Área
FL8	508	Logarítmica	FL8-Área

Para cada combinación de anticuerpos monoclonales se calculó la matriz de compensación con el software FACSDiva v6.1.3 (BD). Para ello se marcaron células con cada uno de los ocho anticuerpos por separado adquiriéndose 50,000 células. En la Tabla 7 se muestran las compensaciones utilizadas.

Tabla 7.a: Rango de compensaciones utilizado en el estudio de subpoblaciones B.

	FITC	PE	PerCP.Cy5.5	PE.Cy7	APC	APC.H7	BV421	BV510
FITC	-	10.7 - 15.6	2.4 - 3.2	0.2 - 0.3	0.0	0.0	0.0	2.3 - 3.1
PE	0.7 - 0.8	-	26.6 - 27.3	2.3 - 2.4	0.0	0.0	0.0	0.00
PerCP.Cy5.5	0.0	0.0	-	21.5 - 21.6	1.2 - 1.3	3.2 - 3.7	0.0	0.00
PE.Cy7	0.0 - 0.1	0.6 - 0.8	4.4 - 4.7	-	0.0	5.0 - 5.5	0.0	0.00
APC	0.0	0.0	1.8 - 2.0	0.0 - 0.2	-	7.7 - 8.6	0.0	0.00
APC.H7	0.0	0.0	0.0 - 0.2	3.3 - 3.9	2.6 - 2.7	-	0.0	0.00
BV421	0.2 - 0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	9.9 - 12.6
BV510	1.0 - 1.6	0.6 - 0.7	0.4 - 0.5	0.0	0.0	0.0	10.6 - 13.1	-

APC, alofocianina. APC-H7, alofocianina análogo de cianina 7. BV, brillant violet. FITC, fluorescein-isotiocianato. PE, ficoeritrina. PerCP-Cy5.5, proteína peridinin clorofila-cianina 5. PE-Cy7, ficoeritrina-cianina 7.

Tabla 7.b: Matriz de compensación utilizada en los estudios de contaminación con sangre periférica en muestras de médula ósea

	FITC	PE	PerCP.Cy5.5	PE.Cy7	APC	APC.H7
FITC	-	10.6	2.5	0.2	0.0	0.0
PE	1.5	-	27.3	2.4	0.0	0.0
PerCP.Cy5.5	0.0	0.0	-	21.5	1.4	3.2
PE.Cy7	0.0	0.7	4.7	-	0.0	3.7
APC	0.0	0.0	1.8	0.2	-	8.5
APC.H7	0.0	0.0	0.2	3.4	2.1	-

APC, alofocianina. APC-H7, alofocianina análogo de cianina 7. FITC, fluorescein-isotiocianato. PE, ficoeritrina. PerCP-Cy5.5, proteína peridinin clorofila-cianina 5. PE-Cy7, ficoeritrina-cianina 7.

3. PROTOCOLO DE CITOMETRÍA

3.1. Estándar

Se incubaron 100 µL de muestra con los AcMo correspondientes. Tras 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se añadieron 2 mL de solución lisante de hematíes (FACS-lysingSolution, Becton-Dickinson, BD), incubándose nuevamente a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1800 r.p.m. durante 8 minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 500 µl de PBS.

3.2. Marcaje con inmunoglobulinas de superficie

Se centrifugaron las muestras a 1800 r.p.m. durante 8 minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo en 4 mL de PBS. Tras una incubación de 30 minutos a 37C° se realizó una nueva centrifugación a 1800 r.p.m. durante 8 minutos para finalmente decantar el sobrenadante y comenzar con el marcaje estándar sobre el pellet obtenido.

3.3. Alta sensibilidad

Para el marcaje de muestras de SP se utilizó la técnica de alta sensibilidad previamente descrita (Domingo et al. 2010). En dicha técnica se incrementa el número de leucocitos estudiados mediante la adquisición de varios tubos

individuales marcados con la misma combinación de anticuerpos monoclonales. La información obtenida en cada uno de ellos es fusionada para permitir el análisis conjunto de todos los datos. La determinación del número de tubos necesarios para alcanzar una sensibilidad en torno a 10^{-5} se estableció en función del número de linfocitos B detectables en SP, cuantificados previamente en 200 μL de muestra marcada con anti-CD3^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD19^{PE-Cy7}/anti-CD45^{APC-H7}. Tal y como se describe en el apartado A de resultados, el marcaje de hasta 3 millones de células por tubo y el incremento de la velocidad de adquisición a 12,000 eventos/seg mejora las limitaciones de tiempo y coste que plantea la técnica estándar.

3.4. Adquisición de muestras y análisis

Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACSCantoTMII (BD) con el software FACSDiva v6.1.3 (BD). Es importante destacar que la grabación de datos se inició pasados 10 segundos de adquisición, con el fin de evitar las turbulencias iniciales del frente de la muestra. Los archivos de citometría generados fueron analizados con el software InfinicytTM v1.6 y v1.7 (Cytognos). Todos los archivos fueron codificados durante la adquisición, con el fin de analizarlos de forma ciega.

La adquisición de muestras de SP y MO se realizó mediante el proceso de “doble adquisición”. Este proceso se basa en generar un fichero preliminar de 30.000 eventos en el cual se establece una región de selección o “gateo” CD19⁺ que delimita los eventos guardados.

4. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO SIMPLIFICADO DE CITOMETRÍA DE ALTA SENSIBILIDAD

4.1. Análisis de máxima tasa de flujo en la adquisición de muestras

Se utilizaron 17 muestras, 11 de MO y 6 de SP de otros tantos pacientes, de concentración celular variable (Tabla 8).

Cada muestra se sometió a 6 procedimientos idénticos de marcaje. La combinación de AcMo utilizada para las muestras de MO fue anti-CD38^{FITC}/anti-CD34^{PE}/anti-CD138^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD19^{PE-Cy7}/anti-CD4^{APC}/anti-CD45^{APC-H7}, y para las de SP, anti-CD34^{PE}/anti-CD45^{APC-H7}.

Tras el marcaje, la resuspensión final de las células se realizó en tres volúmenes diferentes de PBS, establecidos en función de la concentración inicial de la muestra. En cada muestra, dos tubos recibieron un volumen alto de PBS (2 - 3 mL), dos tubos un volumen intermedio (700 µL - 1,5 mL) y los dos últimos un volumen bajo (350 - 500 µL). De este modo, una misma muestra se adquirió con tres tasas de flujo diferentes, cada una de ellas por duplicado. Como velocidad de adquisición se utilizó 120 µL/min (modo del citómetro “*flow rate high*”).

Tabla 8: Concentración inicial de las muestras utilizadas para el análisis de tasa de flujo.

Caso	Muestra	Concentración	Caso	Muestra	Concentración
TF1	SP	5.1	TF10	MO	80
TF2	SP	5.1	TF11	MO	80
TF3	SP	6.6	TF12	MO	60
TF4	SP	6.0	TF13	MO	60
TF5	MO	80	TF14	MO	80
TF6	MO	59	TF15	MO	20
TF7	SP	7.6	TF16	MO	80
TF8	SP	4.7	TF17	MO	68
TF9	MO	60			

Concentración medida en $\times 10^6$ leucocitos/mL

4.2. Análisis de máxima concentración celular en el marcaje de muestras.

Se utilizaron 17 muestras de MO (CNC1 - CNC17) cuya concentración celular inicial era superior a 80 millones de células/mL (mill cel/mL), ajustándolas en PBS a 20, 40 y 80 mill cel/mL.

Cada una de las muestras se marcó por triplicado a cada una de las tres concentraciones celulares. En cada marcaje se utilizaron 100 μ L, por lo que de cada muestra se marcaron 2, 4 y 8 millones de células.

La combinación de AcMo utilizada fue anti-CD38^{FITC}/anti-CD34^{PE}/anti-CD138^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD19^{PE-Cy7}/anti-CD4^{APC}/anti-CD45^{APC-H7}. En todos los marcajes se utilizó la concentración de AcMo recomendada por el fabricante, sin incrementarla a pesar del aumento en la concentración celular.

La resuspensión final de las células para su adquisición en el citómetro se realizó a razón de 500 μ L de PBS por cada 2 millones de células, es decir, se añadieron 500 μ L a los tubos que contenían 2 millones de células, 1 mL a los de 4 y 2 mL a los de 8. La velocidad de adquisición fue de 120 μ L/min en todos los casos (modo del citómetro “*flow rate high*”).

Se analizaron las poblaciones de células plasmáticas (CD38⁺⁺ CD138⁺), células CD34⁺ (CD34⁺ CD45^{lo}), linfocitos B (CD19⁺ CD45⁺) y linfocitos T CD4⁺ (CD4⁺ CD45⁺).

Para la comparación entre 20 y 30 mill cel/mL, se utilizaron 10 muestras de MO (CNC18 - CNC27) ajustadas en PBS a ambas concentraciones celulares. El protocolo y especificaciones de marcaje fueron los mismos que los descritos para la comparación entre 20, 40 y 80 mill cel/mL.

5. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES B

5.1. Caracterización B normal

Se han analizado muestras de médula ósea (n=12), sangre periférica (n=12), amígdala (n=10), bazo (n=10) y ganglio linfático (n=10) procedentes de pacientes y donantes cuyas características se muestran en la Tabla 9.

Las muestras de MO se procesaron previamente para ajustar la concentración de marcaje. Se filtraron con filtros Cell Strainer de 40µm (BD) utilizando PBS como diluyente. Se centrifugaron a 1800 r.p.m. durante 8 minutos y una vez eliminado el sobrenadante, se ajustaron a una concentración final de 30×10^6 cels/mL en PBS (máxima concentración de marcaje previamente establecida).

En el caso de las muestras de BZ, AMG y GL se utilizó un proceso de disgregación físico mediante bisturí, utilizando PBS como diluyente. Del mismo modo que con las muestras de MO, se filtraron y ajustaron a una concentración final de marcaje de 30×10^6 cels/mL. La cuantificación de leucocitos se realizó en el contador hematológico ABX Pentra 60 (HORIBA ABX Diagnostics).

Tabla 9: Muestras utilizadas para la caracterización de subpoblaciones B normales.

Muestra	Sexo	Edad	Observaciones	Muestra	Sexo	Edad	Observaciones
SP1	M	27	Donante sano	BZ6	V	77	Donante cadáver
SP2	V	28	Donante sano	BZ7	V	67	Donante cadáver
SP3	V	31	Donante sano	BZ8	V	66	Donante cadáver
SP4	M	31	Donante sano	BZ9	V	16	Donante cadáver
SP5	M	25	Donante sano	BZ10	M	66	Donante cadáver
SP6	M	50	Donante sano	GL1	V	25	Adenopatía, SEH
SP7	M	61	Donante sano	GL2	V	46	Adenopatía, SEH
SP8	M	58	Donante sano	GL3	V	54	Donante cadáver
SP9	V	57	Donante sano	GL4	M	81	Donante cadáver
SP10	V	65	Donante sano	GL5	M	82	Donante cadáver
SP11	V	58	Donante sano	GL6	V	48	Donante cadáver
SP12	M	57	Donante sano	GL7	V	31	Donante cadáver
AMG1	M	2	Amigdalectomía	GL8	M	46	Adenopatía, SEH
AMG2	M	3	Amigdalectomía	GL9	M	90	Donante cadáver
AMG3	V	30	Amigdalectomía	GL10	V	77	Donante cadáver
AMG4	V	5	Amigdalectomía	MO1	M	20	Donante sano
AMG5	V	5	Amigdalectomía	MO2	M	22	Donante sano
AMG6	V	3	Amigdalectomía	MO3	M	25	Donante sano
AMG7	V	4	Amigdalectomía	MO4	M	20	Donante sano
AMG8	V	8	Amigdalectomía	MO5	M	21	Donante sano
AMG9	V	12	Amigdalectomía	MO6	M	22	Donante sano
AMG10	M	3	Amigdalectomía	MO7	M	22	Donante sano
BZ1	V	54	Donante cadáver	MO8	M	21	Donante sano
BZ2	M	81	Donante cadáver	MO9	V	22	Donante sano
BZ3	M	82	Donante cadáver	MO10	M	22	Donante sano
BZ4	V	31	Donante cadáver	MO11	M	27	Donante sano
BZ5	M	90	Donante cadáver	MO12	V	20	Donante sano

Las muestras de donante cadáver se obtuvieron del material sobrante de los estudios de histocompatibilidad previos al trasplante de órganos en el Servicio de Inmunología de la Clínica Universidad de Navarra. Las muestras de amígdala (AMG) se obtuvieron a partir del material sobrante de amigdalectomías llevadas a cabo por el Departamento de otorrinolaringología de la Clínica Universidad de Navarra. BZ, bazo. GL, ganglio linfático. M, mujer. MO, médula ósea. SP, sangre periférica, SEH, sin enfermedad hematológica. V, varón.

La combinación de AcMo utilizada en las muestras de SP y de MO fue anti-IgD^{FITC}/anti-CD19^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD24^{PE-Cy7}/anti-CD38^{APC}/anti-CD3^{APC-H7}/anti-CD27^{BV421}/anti-IgM^{BV510}. En las muestras de amígdala, bazo y ganglio la combinación de AcMo fue, anti-IgD^{FITC}/anti-CD3^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD24^{PE-Cy7}/anti-CD38^{APC}/anti-CD20^{APC-H7}/anti-CD27^{BV421}/anti-IgM^{BV510}, junto con 7-amino-actinomicina D o 7-AAD (Via-ProbeTM, Becton-Dickinson, BD) para facilitar la exclusión de células apoptóticas. En ambas combinaciones se dejó vacía la posición de ficoeritrina (PE) para permitir el estudio de expresión de diferentes moléculas en las subpoblaciones B. Los AcMo incluidos en PE fueron anti-CD1c, anti-CD10, anti-CD21, anti-CD23, anti-B220 y anti-JAMC.

Durante el proceso de adquisición en el citómetro se analizó un millón de leucocitos totales para las muestras de amígdala, bazo y ganglio. En el caso de SP y MO se realizó el proceso de “doble adquisición” anteriormente descrito en el apartado 3.4. Hay que destacar que en ningún caso la tasa de flujo excedió los 12,000 eventos/seg, flujo máximo establecido previamente.

5.2. Análisis de contaminación con sangre periférica en muestras de médula ósea

En todos los estudios de citometría realizados en muestras de MO en el servicio de Inmunología de la Clínica Universidad de Navarra (CUN) se incluyó a partir de 2010 la siguiente combinación de AcMo: anti-CD38^{FITC}/anti-CD34^{PE}/anti-CD138^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD19^{PE-Cy7}/anti-CD10^{APC}/anti-CD45^{APC-H7}.

Con estos marcadores se analizaron los porcentajes de células plasmáticas (CD38⁺⁺ CD138⁺ CD19⁺) y de células CD34⁺ (CD34⁺ CD45^{+lo}) referidos al total de leucocitos, así como el porcentaje de neutrófilos (CD45⁺ CD10⁺ SSC^{hi}) con respecto a la población granulocítica.

La contaminación de una muestra de MO con SP disminuirá presumiblemente su porcentaje de células plasmáticas y células CD34⁺, puesto que ambas poblaciones están prácticamente ausentes en SP. Inversamente, el porcentaje de neutrófilos referido a la población granulocítica de médula ósea aumentará a

medida que la contaminación con SP de la muestra sea mayor, puesto que todos los granulocitos (no eosinófilos) de SP son neutrófilos (Figura 4).

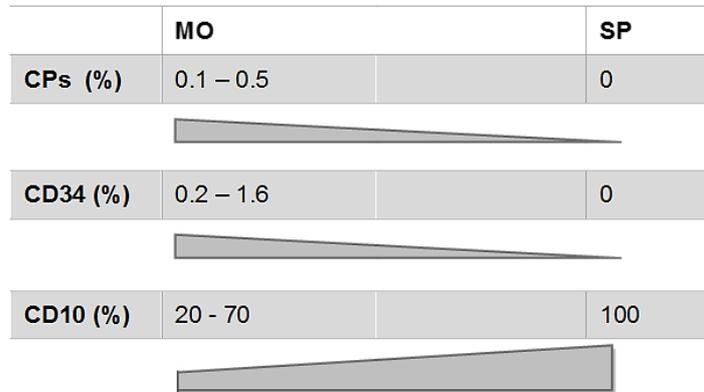


Figura 4: Valores normales del porcentaje de células plasmáticas (CPs) y células CD34⁺ con respecto al total de leucocitos, y de células CD10⁺ en la población de granulocitos no Eosinófilos en médula ósea (MO) y sangre periférica (SP).

De las muestras de MO recibidas entre 2011 y 2014, se seleccionaron 122 (M1-122) que cumplían los siguientes criterios:

- Ausencia de enfermedad hematológica en la muestra.
- Ausencia de enfermedad tumoral no hematológica en la muestra.
- Ausencia de tratamiento quimioterápico en los 12 meses anteriores a la extracción de la muestra.

Se incluyeron por tanto muestras de pacientes sin enfermedad hematológica, de pacientes con linfoma sin afectación medular, y de pacientes con enfermedades hematológicas diversas en remisión completa por un periodo mayor a 12 meses (Tabla 10).

Tabla 10: Muestras de médula ósea sin enfermedad hematológica incluidas en el estudio de contaminación con sangre periférica.

Muestra	Sexo	Edad	Diagnóstico	Muestra	Sexo	Edad	Diagnóstico
BM1	M	64	LLA-B	BM62	M	59	SEH
BM2	M	65	LLA-B	BM63	V	67	LNH-B
BM3	M	32	LLA-T	BM64	M	62	SEH
BM4	M	33	LLA-T	BM65	V	26	LNH-T
BM5	V	44	SEH	BM66	M	13	LLA-B
BM6	V	71	SEH	BM67	M	14	LLA-B
BM7	V	38	SEH	BM68	M	76	SEH
BM8	V	57	LH	BM69	V	66	LNH-T
BM9	V	70	SEH	BM70	M	36	LNH-T
BM10	M	69	SEH	BM71	M	81	SEH
BM11	M	59	SEH	BM72	V	64	LNH-T
BM12	V	41	LNH-B	BM73	V	63	SEH
BM13	M	31	SEH	BM74	M	36	LH
BM14	M	75	SEH	BM75	V	51	SEH
BM15	M	58	SEH	BM76	V	38	SEH
BM16	V	68	SEH	BM77	M	35	SEH
BM17	V	66	LNH-B	BM78	V	64	SEH
BM18	M	33	SEH	BM79	V	40	SEH
BM19	M	37	SEH	BM80	M	58	SEH
BM20	M	37	SEH	BM81	V	26	SEH
BM21	M	37	SEH	BM82	V	35	LMA
BM22	V	61	SEH	BM83	V	65	SEH
BM23	V	57	LNH-B	BM84	V	58	LMA
BM24	V	36	SEH	BM85	V	68	SEH
BM25	V	68	SEH	BM86	V	77	SEH
BM26	V	43	LNH-B	BM87	V	75	LNH-B
BM27	M	41	SEH	BM88	M	45	LNH-B
BM28	V	33	SEH	BM89	V	53	LNH-B
BM29	M	54	SEH	BM90	V	70	LNH-B
BM30	V	53	LNH-T	BM91	V	58	LNH-B
BM31	M	41	SEH	BM92	M	47	SEH
BM32	V	66	LNH-B	BM93	V	70	SEH
BM33	V	54	SEH	BM94	M	70	SEH
BM34	M	59	SEH	BM95	V	53	LNH-B
BM35	M	63	LNH-B	BM96	V	77	SEH
BM36	V	47	SEH	BM97	V	58	SEH
BM37	V	61	SEH	BM98	M	67	LNH-B
BM38	V	70	LNH-B	BM99	V	60	SEH
BM39	M	59	SEH	BM100	M	41	SEH
BM40	M	69	SEH	BM101	V	69	SEH
BM41	V	30	SEH	BM102	M	77	SEH
BM42	V	51	SEH	BM103	M	45	LNH-B
BM43	V	51	SEH	BM104	V	22	LH
BM44	V	62	LNH-T	BM105	M	60	LNH-B
BM45	V	52	LNH-B	BM106	M	60	SEH
BM46	V	52	SEH	BM107	M	74	LNH-B
BM47	M	58	SEH	BM108	V	68	SEH
BM48	V	73	LNH-B	BM109	V	63	SEH
BM49	V	70	SEH	BM110	V	64	SEH
BM50	V	65	SEH	BM111	V	70	SEH
BM51	M	63	LNH-T	BM112	V	85	SEH
BM52	M	58	SEH	BM113	V	60	SEH
BM53	V	57	LMA	BM114	V	82	SEH
BM54	M	59	SEH	BM115	M	67	LNH-B
BM55	V	55	SEH	BM116	M	69	LH
BM56	M	73	SEH	BM117	M	75	LNH-B
BM57	M	70	LNH-B	BM118	M	77	LNH-B
BM58	V	57	SEH	BM119	M	75	LNH-B
BM59	V	57	SEH	BM120	V	61	SEH
BM60	V	67	SEH	BM121	V	59	LMA
BM61	V	7	SEH	BM122	V	60	LMA

LH, linfoma de Hodgkin. LNH, linfoma no Hodgkin. LLA, leucemia linfoblástica aguda. LMA, leucemia mieloblástica aguda. SEH, sin enfermedad hematológica. M, mujer. V, varón.

Asimismo se seleccionaron 89 muestras de MO que presentaban afectación por algún tipo de enfermedad hematológica (BM123-211) (Tabla 11).

Tabla 11: Muestras de médula ósea con enfermedad hematológica incluidas en el estudio de contaminación con sangre periférica.

Muestra	Sexo	Edad	Diagnóstico	Muestra	Sexo	Edad	Diagnóstico
BM123	58	M	MGUS	BM168	58	V	MM
BM124	42	M	MGUS	BM169	71	V	SLP-B
BM125	79	V	MGUS	BM170	53	V	SLP-B
BM126	47	M	MGUS	BM171	47	V	SLP-B
BM127	80	M	MGUS	BM172	63	V	SLP-B
BM128	71	V	MGUS	BM173	67	V	SLP-B
BM129	78	V	MGUS	BM174	56	M	SLP-B
BM130	77	V	MGUS	BM175	81	M	SLP-B
BM131	76	V	MGUS	BM176	76	M	SLP-B
BM132	70	V	MGUS	BM177	60	V	SLP-B
BM133	37	M	MGUS	BM178	81	V	SLP-B
BM134	82	M	MM	BM179	59	M	SLP-B
BM135	66	M	MM	BM180	69	M	SLP-B
BM136	65	V	MM	BM181	69	M	SLP-B
BM137	75	M	MM	BM182	71	M	SLP-B
BM138	72	V	MM	BM183	76	M	SLP-B
BM139	64	M	MM	BM184	55	M	SLP-B
BM140	70	V	MM	BM185	58	V	SLP-B
BM141	69	V	MM	BM186	42	V	SLP-B
BM142	78	V	MM	BM187	72	V	SLP-B
BM143	63	V	MM	BM188	60	M	SLP-B
BM144	74	V	MM	BM189	83	V	SMD
BM145	71	M	MM	BM190	81	M	SMD
BM146	64	V	MM	BM191	80	M	SMD
BM147	58	V	MM	BM192	67	V	SMD
BM148	78	M	MM	BM193	61	V	SMD
BM149	80	H	MM	BM194	51	V	SMD
BM150	46	H	MM	BM195	68	V	SMD
BM151	67	H	MM	BM196	69	V	SMD
BM152	79	M	MM	BM197	74	V	SMD
BM153	73	V	MM	BM198	54	V	SMD
BM154	80	V	MM	BM199	56	V	SMD
BM155	53	M	MM	BM200	63	V	SMD
BM156	72	M	MM	BM201	75	V	SMD
BM157	73	M	MM	BM202	66	M	SMD
BM158	75	V	MM	BM203	70	V	SMD
BM159	58	V	MM	BM204	65	V	SMD
BM160	61	V	MM	BM205	66	V	SMD
BM161	84	V	MM	BM206	57	V	SMD
BM162	65	M	MM	BM207	73	M	SMD
BM163	71	M	MM	BM208	70	V	SMD
BM164	47	V	MM	BM209	95	M	SMD
BM165	49	V	MM	BM210	71	V	SMD
BM166	64	M	MM	BM211	72	V	SMD
BM167	42	M	MM				

MGUS, gammapatía monoclonal de significado incierto. MM, mieloma múltiple. SLP-B, síndrome linfoproliferativo B. SMD, síndrome mielodisplásico. M, mujer; V, varón.

El porcentaje de células plasmáticas del medulograma se obtuvo de la Unidad de Morfología del Servicio de Hematología de la Clínica Universidad de Navarra. El análisis se realizó por microscopía óptica mediante la tinción May Grünwald-Giemsa.

5.3. Muestras de PAAF de tiroides

Se estudiaron las subpoblaciones B de 10 muestras de PAAF (Punción-Aspiración con Aguja Fina) obtenidas a partir de áreas hipoecoicas de tiroides. En todos los casos correspondieron al excedente de muestra recibido en el Servicio de Inmunología de la Clínica Universidad de Navarra (entre 2011 y 2014) para la realización de un cribaje por citometría de Síndrome Linfoproliferativo Crónico. El diagnóstico final fue de tiroiditis linfocitaria en todas las muestras excepto TIR3, que recibió el diagnóstico de Linfoma difuso de células grandes B. (Tabla 12).

Tabla 12: Muestras de PAAF de tiroides incluidas en el estudio

Muestra	Edad	Sexo	Muestra	Edad	Sexo
TIR1	60	V	TIR6	62	M
TIR2	53	M	TIR7	41	M
TIR3	70	V	TIR8	61	V
TIR4	33	V	TIR9	65	M
TIR5	1	M	TIR10	47	M

M, mujer. V, varón

Para el cribaje rutinario por citometría se incluyó la siguiente combinación de anticuerpos anti-Kappa^{FITC}/anti-Lambda^{PE}/7-AAD^{Percp.Cy5.5}/anti-CD19^{PE.Cy7}/anti-CD10^{APC}/anti-CD20^{APC.H7}/anti-CD3^{V450}/anti-CD45^{V500}. Esta combinación permitió analizar las proporciones Kappa y Lambda en los linfocitos B (CD19⁺, CD20⁺), excluyendo del análisis linfocitos T (CD3⁺) y células apoptóticas (7-AAD⁺).

Para el estudio de subpoblaciones B se utilizó la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: anti-IgD^{FITC}/anti-CD21^{PE}/anti-CD3 + 7-ADD^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD24^{PE-Cy7}/anti-CD38^{APC}/anti-CD20^{APC-H7}/anti-CD27^{BV421}/anti-IgM^{BV510} analizándose un total de 300,000 leucocitos.

5.4. Pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con Rituximab

Se analizaron 72 muestras de 33 pacientes diagnosticados de distintas enfermedades autoinmunes, por las que recibían tratamiento con Rituximab en la Clínica Universidad de Navarra o el Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario de Navarra, entre los años 2012 y 2014. Las características de los pacientes, así como las pautas de tratamiento se muestran en la Tabla 13. Las extracciones de muestra se hicieron coincidir con las revisiones que los pacientes tenían estipuladas.

La evaluación clínica fue realizada por el médico responsable, al igual que la determinación del DAS (*"Disease Activity Score"* o índice combinado de actividad de enfermedad) en el caso de pacientes con Artritis Reumatoide. Los valores obtenidos de DAS28 (DAS obtenido a partir del recuento del dolor en 28 articulaciones) se muestran en la Tabla 14.

La combinación de marcadores utilizada fue anti-IgD^{FITC}/anti-CD21^{PE}/anti-CD19^{PerCP-Cy5.5}/anti-CD24^{PE-Cy7}/anti-CD38^{APC}/anti-CD3^{APC-H7}/anti-CD27^{BV421}/anti-IgM^{BV510}. El número de leucocitos adquiridos así como la sensibilidad alcanzada en cada caso se muestran en la Tabla 32, página 105.

Tabla 13: Muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes en tratamiento con Rituximab incluidos en el estudio

Muestra	Sexo	Edad	Diag.	Años de evolución	Tiempo post-Rx (meses)	Ciclos de Rx	Nº dosis en ciclo	mg/dosis	Otros tratamientos
AR1.a	M	71	AR	15	10	1	2	1,000	Prednisona 10 mg/d, etanercept 50 mg/s
AR1.b					13	1	2	1,000	Prednisona 10 mg/d, etanercept 50 mg/s
AR1.c					14	1	2	1,000	Prednisona 10 mg/d, etanercept 50 mg/s
AR1.d					17	1	2	1,000	Prednisona 10 mg/d, etanercept 50 mg/s
AR2.a	V	60	AR	3	6	3	2	1,000	Prednisona 5 mg/d
AR2.b					4	4	2	1,000	Prednisona 2.5 mg/d
AR2.c					6	4	2	1,000	Prednisona 2.5 mg/d
AR3.a	M	69	AR	2	5	1	2	1,000	Prednisona 5 mg/d
AR3.b					7	2	2	1,000	Prednisona 2.5 mg/d
AR4.a	M	51	AR	3	10	3	2	1,000	MTX 15 mg/s
AR4.b					15	3	2	1,000	MTX 15 mg/s
AR4.c					19	3	2	1,000	MTX 10 mg/s
AR5.a	M	51	AR	13	4	9	2	1,000	Prednisona 5 mg/d, Abatacept 200 mg/s
AR5.b					13	9	2	1,000	Prednisona 5 mg/d
AR6.a	M	55	AR, SS	6	6	4	2	1,000	Prednisona 5 mg/d
AR6.b					6	5	2	500	Prednisona 2.5 mg/d
AR6.c					6	6	2	500	Prednisona 5 mg/d
AR7.a	M	54	AR	7	12	4	2	1,000	MTX 10 mg/s
AR7.b					7	5	2	1,000	MTX 10 mg/s
AR7.c					12	5	2	1,000	MTX 10 mg/s
AR8.a	V	66	AR, SS	9	9	7	2	1,000	Sin tratamiento
AR9.a	V	66	AR	2	5	1	2	1,000	Prednisona 15mg/d
AR10.a	M	63	AR, LES	4	6	3	2	1,000	Prednisona 2,5 mg/d, dolquine 400 mg/d
AR10.b					5	4	2	1,000	Dolquine 400 mg/d
AR10.c					12	4	2	1,000	Dolquine 400 mg/d
AR11.a	M	49	AR	16	9	9	2	1,000	Leflunomida 10 mg/d
AR11.b					4	10	2	1,000	Leflunomida 10 mg/d
AR12.a	M	60	AR	3	11	2	2	1,000	Sin tratamiento
AR12.b					12	3	2	1,000	Sin tratamiento
AR13.a	V	59	AR	2	6	1	2	1,000	Prednisona 10 mg/d
AR14.a	V	68	AR	8	9	3	2	1,000	Sin tratamiento
AR14.b					4	4	2	1,000	Sin tratamiento
AR15.a	M	60	AR	4	6	4	2	1,000	Prednisona 7.5 mg/d
AR16.a	M	85	AR	8	9	1	2	1,000	Sin tratamiento
AR16.b					6	2	2	1,000	Sin tratamiento
AR17.a	V	58	AR	8	23	4	2	1,000	MTX 10 mg/s, prednisona 5 mg/d
AR17.b					6	5	2	1,000	MTX 15 mg/s, prednisona 2,5mg/d
AR18.a	M	51	AR	10	8	6	2	1,000	MTX 7.5 mg/s
AR18.b					5	7	2	1,000	MTX 7.5 mg/s
AR18.c					12	7	2	1,000	MTX 7.5 mg/s
AR19.a	M	50	AR	1	12	1	2	1,000	Sin tratamiento
AR20.a	M	67	AR	7	12	5	2	1,000	Leflunomida 20 mg/d
AR21.a	M	74	AR	12	23	5	2	1,000	Leflunomida 20 mg/d

Tabla 13: Continuación

Muestra	Sexo	Edad	Diag.	Años de evolución	Tiempo post-Rx (meses)	Ciclos de Rx	Nº dosis en ciclo	mg/dosis	Otros tratamientos
AR21.b					6	6	2	1,000	Leflunomida 20 mg/d
AR22.a	V	64	AR	6	11	2	2	1,000	Sin tratamiento
AR23.a	M	64	AR	13	6	7	2	1,000	Prednisona 5 mg/d, leflunomida 10 mg/d
O1.a	M	41	EA	9	10	1	4	500	Prednisona 5mg/d, sulfasalazina 2g/d
O1.b					17	1	4	500	Prednisona 5mg/d, sulfasalazina 2g/d
O1.c					20	1	4	500	Sin tratamiento
O2.a	M	77	GP	1	11	1	4	680	Prednisona 30 mg/d, Imurel 50mg/d
O2.b					19	1	4	680	Prednisona 5 mg/d, Imurel 100mg/d
O2.c					21	1	4	680	Prednisona 5 mg/d, Imurel 100mg/d
O2.d					26	1	4	680	Prednisona 2.5 mg/d, Imurel 100mg/d
O2.e					30	1	4	680	Prednisona 2.5 mg/d, Imurel 100mg/d
O3.a	V	27	NMO	9	4	2	4	780	Inmunoglobulinas
O3.b					6	2	4	780	Inmunoglobulinas
O3.c					9	2	4	780	Inmunoglobulinas
O3.d					5	3	4	780	Inmunoglobulinas
O3.e					8	3	4	780	Inmunoglobulinas
O4.a	M	11	HFL	1	6	1	4	460	Sin tratamiento
O4.b					12	1	4	460	Sin tratamiento
O5.a	V	47	SA	1	9	1	2	1,000	Prednisona 5mg/d
PV1.a	V	57	PV	3	16	1	4	700	Prednisona 7,5mg/d
PV1.b	V	57	PV	3	35	1	4	700	Prednisona 5mg/d
PV2.a	M	76	PV	4	14	1	4	600	Prednisona 5mg/d
PV2.b					20	1	4	600	Prednisona 5mg/d
PV2.c					30	1	4	600	Prednisona 5mg/d
PV3.a	V	40	PV	10	14	3	4	700	Prednisona 5mg/d
PV4.a	M	46	PV	2	12	1	4	570	Prednisona 5mg/d
PV4.b					18	1	4	570	Prednisona 5mg/d
PV5.a	V	63	PV	6	14	1	4	750	Prednisona 5 mg/d, Imurel 50mg/d
PV5.b					22	1	4	750	Prednisona 5 mg/día

Diagnóstico y tiempo de evolución de la enfermedad de cada paciente, así como número de muestras obtenido de cada uno. En cuanto al Rituximab se muestra el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la recogida de la muestra, el número de ciclos recibidos hasta el momento y el número de dosis administradas en cada ciclo. También se incluyen las pautas de tratamiento administradas junto con Rituximab, y otros tratamientos que ha recibido el paciente antes del inicio de la línea con Rituximab. AR, artritis reumatoide. EA, epidermólisis ampollosa. GP, Granulomatosis con poliangeítis (antigua vasculitis de Wegener). HFL, hiperplasia folicular linfoide. LES, lupus eritematoso sistémico. NMO, neuromielitis óptica. M, mujer. PV, pénfigo vulgar. Rx, Rituximab. SA, enfermedad sistémica autoinmune. S-H, nefropatía IgA Schönlein-Henoch. SS, síndrome de sjogren. V, varón.

Tabla 14: DAS28 de los pacientes en el momento en que se analizaron las muestras

Muestra	DAS28	Muestra	DAS28
AR2.a	3.89	AR18.b	1.20
AR2.b	3.13	AR7.a	1.56
AR2.c	3.41	AR7.c	1.20
AR3.a	3.83	AR8.a	3.35
AR7.b	1.05	AR11.a	3.15
AR11.b	2.79	AR12.a	2.10
AR14.b	1.8	AR14.a	6.36
AR15.a	4.41	AR18.c	0.91
AR16.b	3.2	AR19.a	3.46
AR17.b	0.91	AR20.a	1.16
AR18.a	0.63	AR22.a	2.10
AR21.b	2.21	AR16.a	5.30
AR23.a	2.05	AR17.a	2.10
AR6.a	3.64	AR21.a	4.89
AR6.b	3.46		

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas IBM SPSS Statistics versión 20 y GraphPad Prism versión 6. En todos los casos el límite de significación se estableció en 0.05.

Para el estudio de normalidad de las variables se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. En el estudio de contaminación con SP se utilizaron los coeficientes de asimetría y curtosis, considerando normales aquellas variables cuyos coeficientes incluían el valor cero en el intervalo de confianza del 95%.

En los análisis de subpoblaciones de linfocitos B, la comparación de variables independientes se realizó mediante la prueba T de Student en el caso de variables normales y U de Mann-Whitney en caso contrario. La correlación entre variables se estudió mediante el análisis de Pearson en el caso de variables paramétricas y mediante la prueba de Spearman para variables no

paramétricas. La comparación de datos pareados se realizó con el test Wilcoxon aplicando la corrección de Bonferroni en caso de múltiples comparaciones dos a dos. Para la comparación conjunta de más de dos muestras pareadas se utilizó el test de Friedman y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso de muestras no pareadas.

En el estudio de contaminación con SP, la clasificación de las muestras se realizó mediante el análisis multivariante de conglomerados jerárquicos, utilizando el método de vinculación intergrupos, con distancia euclídea al cuadrado como intervalo y estandarizando los valores de las variables mediante puntuaciones Z.

Para la estimación del grado de contaminación y la clasificación de las muestras se realizó un análisis discriminante, utilizando las variables porcentaje de células CD34⁺, células plasmáticas y células CD10⁺. Mediante los coeficientes estandarizados se valoró el peso de cada variable dentro del análisis. Como variable de agrupación se usó la presencia o ausencia de contaminación, establecida previamente con el análisis de conglomerados jerárquicos. La función canónica discriminante se obtuvo con los coeficientes no tipificados, sin imputación de datos.

En los análisis de muestras post-Rx, la comparación de variables se realizó mediante el test U de Mann-Whitney, mientras que las correlaciones entre variables se estudiaron mediante la prueba de Spearman.

Resultados

A. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO SIMPLIFICADO DE CITOMETRÍA DE ALTA SENSIBILIDAD.

1. MÁXIMA TASA DE FLUJO EN LA ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

1.1. Análisis de abortos electrónicos en muestras adquiridas a diferente tasa de flujo

Tal y como se explica en Material y Métodos, se adquirieron 17 muestras por duplicado con niveles crecientes de tasa de flujo: flujo bajo (F^{lo}) (mediana, 3,375 eventos por segundo) (ev/seg), flujo medio (F^{med}) (mediana, 5,508 ev/seg) y flujo alto (F^{hi}) (mediana, 11,577 ev/seg) (Tabla 15).

Tabla 15: Tasa de flujo utilizada en la adquisición de muestras

Muestra	F^{lo}	F^{med}	F^{hi}
TF1	3,375	5,616	11,577
TF2	ND	6,060	11,728
TF3	ND	6,838	13,061
TF4	2,628	5,661	12,663
TF5	ND	5,358	13,043
TF6	3,545	4,913	10,627
TF7	3,234	6,140	11,765
TF8	1,809	5,780	8,053
TF9	4,513	ND	10,345
TF10	ND	5,557	12,290
TF11	ND	4,766	8,957
TF12	ND	5,662	12,672
TF13	3,846	ND	8,957
TF14	ND	4,962	11,324
TF15	2,487	4,536	7,343
TF16	ND	5,608	12,000
TF17	3,431	5,310	10,912
Mediana	3,375	5,508	11,577
(Rango)	(1,809 – 4,513)	(4,536 – 6,838)	(7,343 – 13,061)

Cada valor es la media de dos determinaciones. F^{lo} , flujo bajo. F^{med} , flujo medio. F^{hi} , flujo alto. ND, no determinado

Se cuantificó el porcentaje de abortos electrónicos de cada adquisición (Tabla 16). A mayor tasa de flujo, mayor porcentaje de abortos electrónicos, observándose una relación lineal significativa entre ambos parámetros con una R de 0.98 (Figura 5).

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de abortos entre los tres niveles establecidos en la tasa de flujo; test de Friedman, $p = 0.001$; Wilcoxon F^{lo} vs F^{med} , $p = 0.017$ y F^{lo} vs F^{hi} , $p = 0.008$.

Tabla 16: Porcentaje de abortos electrónicos en la adquisición de muestras a diferente tasa de flujo.

Muestra	F^{lo}	F^{med}	F^{hi}
TF1	2.28	3.91	8.89
TF2	ND	4.25	9.10
TF3	ND	4.85	10.36
TF4	1.76	3.98	10.41
TF5	ND	3.89	10.42
TF6	3.08	4.37	10.01
TF7	2.23	4.29	9.13
TF8	1.20	4.05	5.84
TF9	3.28	ND	8.30
TF10	ND	4.06	10.17
TF11	ND	3.70	6.83
TF12	ND	4.01	7.75
TF13	2.70	ND	7.07
TF14	ND	3.46	9.00
TF15	1.98	3.63	5.92
TF16	ND	4.04	9.83
TF17	2.89	4.22	9.20
Mediana	2.28	4.04	9.1
(Rango)	(1.2 – 3.28)	(3.46 – 4.85)	(5.84 – 10.42)

Cada valor es la media de dos determinaciones. F^{lo} , flujo bajo. F^{med} , flujo medio. F^{hi} , flujo alto. ND, no determinado

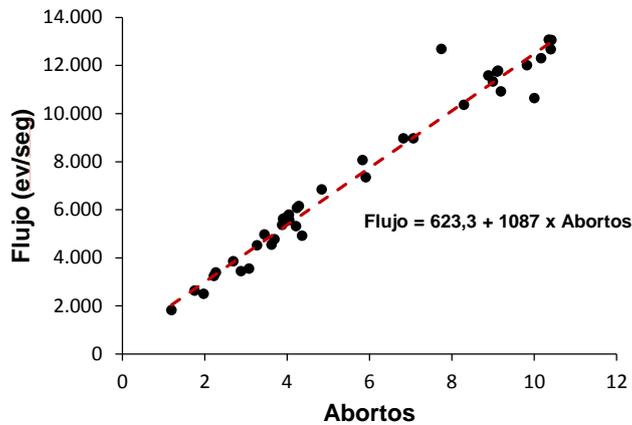


Figura 5: Correlación entre tasa de flujo de adquisición (eje y) y porcentaje de abortos electrónicos (eje x) ($R = 0.98$; $p = 0.0083$).

1.2. Análisis de poblaciones en muestras adquiridas a diferente tasa de flujo

Se analizó el porcentaje de células $CD34^+$, linfocitos B (LB), células plasmáticas (CP) y linfocitos T $CD4^+$ ($LTCD4^+$) en cada muestra, comparando los resultados obtenidos con los tres niveles de tasa de flujo.

Como se muestra en la Tabla 17, los porcentajes de todas las subpoblaciones fueron similares en los tres grupos. El test de Friedman, que comparó el porcentaje de cada población a los tres niveles de flujo utilizados, no fue significativo para ninguna de las 4 poblaciones analizadas. Se realizó también un test de Wilcoxon para comparar el porcentaje obtenido para cada población a F^{lo} vs F^{med} , F^{med} vs F^{hi} y F^{lo} vs F^{hi} , no siendo significativo en ningún caso para ninguna población.

Tabla 17: Porcentaje de células CD34+, linfocitos B, células plasmáticas y linfocitos T CD4+ en cada muestra adquirida con tres niveles de tasa de flujo.

Muestra	Células CD34 ⁺			LB			CP			LTCD4 ⁺		
	F ^{lo}	F ^{med}	F ^{hi}	F ^{lo}	F ^{med}	F ^{hi}	F ^{lo}	F ^{med}	F ^{hi}	F ^{lo}	F ^{med}	F ^{hi}
TF1	0.029	0.035	0.031	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TF2	ND	0.037	0.031	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TF3	ND	0.042	0.041	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TF4	0.033	0.031	0.030	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TF5	ND	0.320	0.300	ND	0.39	0.36	ND	ND	ND	ND	1.44	1.42
TF6	0.040	0.050	0.035	ND	ND	ND	0.025	0.030	0.03	2.60	2.56	2.88
TF7	0.034	0.034	0.035	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TF8	0.028	0.026	0.024	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TF9	0.385	ND	0.375	0.34	ND	0.32	0.525	ND	0.47	2.62	ND	2.61
TF10	ND	0.395	0.390	ND	0.32	0.34	ND	0.550	0.50	ND	2.64	2.59
TF11	ND	2.290	2.240	ND	3.37	3.55	ND	0.450	0.45	ND	5.70	5.82
TF12	ND	1.300	1.180	ND	8.08	7.82	ND	0.210	0.20	ND	1.61	1.62
TF13	0.950	ND	0.940	0.570	ND	0.56	0.520	ND	0.47	6.15	ND	6.07
TF14	ND	0.975	0.920	ND	0.61	0.60	ND	0.570	0.50	ND	6.28	6.19
TF15	0.980	0.970	0.870	2.78	2.69	2.42	0.103	0.110	0.10	5.46	5.18	4.64
TF16	ND	0.795	0.925	ND	0.10	0.09	ND	3.740	3.88	ND	2.63	2.62
TF17	1.150	1.085	1.160	1.65	1.59	1.66	0.120	0.105	0.11	4.88	4.60	4.82

F^{lo}, flujo bajo. F^{med}, flujo medio. F^{hi}, flujo alto. LB, linfocitos B. CP, células plasmáticas. LTCD4⁺, linfocitos T CD4⁺. ND, no determinado.

2. MÁXIMA CONCENTRACIÓN CELULAR EN EL MARCAJE DE MUESTRAS

2.1. Comparación de marcaje a 20, 40 y 80 millones de células/mL

Diecisiete muestras de MO se marcaron por triplicado a tres concentraciones celulares diferentes (20, 40 y 80 mill cel/mL), manteniendo constante el volumen de marcaje (100µl) y la concentración de AcMo.

2.1.1. Concentración de AcMo

Con el fin de determinar si la concentración estándar de AcMo es suficiente para marcar una concentración de 80 mill cel/mL, se comparó la intensidad de fluorescencia del marcador pan-leucocitario CD45 en la población leucocitaria total, marcada a 20 y 80 mill cel/mL. Como muestra la Figura 6, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de CD45 cuando se aumentó la concentración celular a 80 mill cel/mL, sin modificar la cantidad de AcMo en el mismo volumen de marcaje (test de Wilcoxon NS). Por tanto, la concentración de AcMo recomendada por el fabricante es suficiente para marcar, al menos, 8 millones de células.

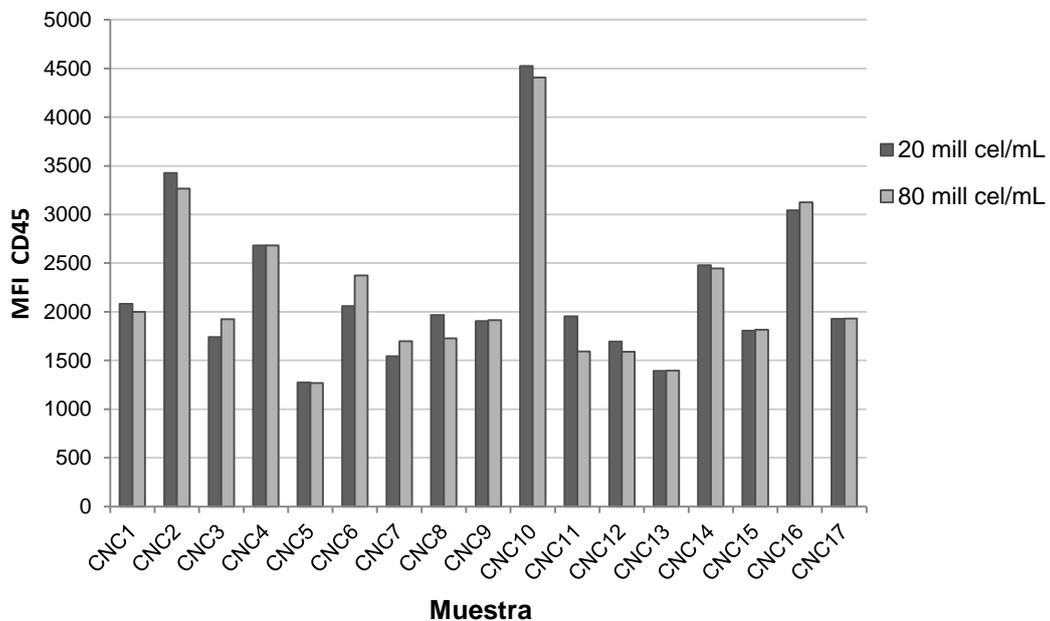


Figura 6: Intensidad de fluorescencia de CD45 en la población leucocitaria total marcada a 20 y 80 x 10⁶ células/mL. MFI, Intensidad media de fluorescencia. Mill cel/mL, millones de células/mL.

2.1.2. Tasa de flujo

La concentración celular se mantuvo constante durante la adquisición de muestras, con el fin de utilizar una misma tasa de flujo a las tres concentraciones celulares de marcaje, que estuvo en torno a 4,800 ev/seg (Tabla 18). El test de Friedman, que comparó la tasa de flujo en los tres grupos no fue significativo, como tampoco lo fue el de Wilcoxon, que comparó la tasa de flujo a la concentración estándar de 20 millones/mL con cada una de las otras dos.

Tabla 18: Tasa de flujo utilizada en la adquisición de muestras a cada una de las tres concentraciones celulares de marcaje.

Muestra	20 x 10⁶	40 x 10⁶	80 x 10⁶
CNC1	3,303	3,796	3,909
CNC2	5,459	5,318	5,358
CNC3	1,642	1,774	1,750
CNC4	5,557	5,548	5,557
CNC5	5,461	ND	5,662
CNC6	3,442	3,439	3,426
CNC7	4,919	ND	4,766
CNC8	3,211	3,797	4,035
CNC9	2,850	3,155	3,432
CNC10	5,128	4,956	4,962
CNC11	3,437	3,474	3,458
CNC12	5,263	5,456	5,608
CNC13	5,508	5,516	5,556
CNC14	4,289	4,803	5,310
CNC15	4,625	4,583	4,114
CNC16	5,592	5,599	5,648
CNC17	6,480	ND	6,682
Mediana (Rango)	4,919 (1,642-6,480)	4,693 (1,774-5,599)	4,962 (1,750-6,682)

20, 40 y 80 x 10⁶ células/mL. Cada uno de los valores corresponde a la media de 3 determinaciones. ND, no determinado.

2.1.3. Número de leucocitos adquiridos

Para cada muestra se adquirió el mismo número de leucocitos a las tres concentraciones celulares de marcaje (Tabla 19): test de Friedman NS; test de Wilcoxon NS, comparando el número de leucocitos adquiridos a la concentración estándar de 20 millones con cada una de las otras dos.

Tabla 19: Número de leucocitos adquiridos a cada una de las tres concentraciones celulares de marcaje.

Muestra	20 x 10 ⁶	40 x 10 ⁶	80 x 10 ⁶
CNC1	963,512	1,012,720	1,009,240
CNC2	182,250	186,000	181,500
CNC3	224,075	225,420	227,709
CNC4	230,010	232,320	235,500
CNC5	246,375	ND	249,765
CNC6	959,216	1,045,814	1,048,000
CNC7	221,775	ND	227,850
CNC8	787,444	769,890	765,527
CNC9	787,224	812,640	809,700
CNC10	250,680	247,050	246,435
CNC11	547,720	542,220	545,760
CNC12	151,065	145,035	147,045
CNC13	251,175	251,625	247,410
CNC14	215,055	214,695	204,225
CNC15	217,515	214,605	216,255
CNC16	270,904	268,560	270,527
CNC17	257,250	ND	259,650
Mediana	250,680	249,338	247,410
(Rango)	(151,065-963,512)	(145,035-1,045,814)	(147,045 - 1,048,000)

20, 40 y 80 x 10⁶ células/mL. Cada uno de los valores corresponde a la media de 3 determinaciones. ND, no determinado.

2.1.4. Estudio de subpoblaciones

Se analizó el porcentaje de células CD34⁺, LB, CP y LTCD4⁺ con respecto a la población leucocitaria total, a cada una de las 3 concentraciones celulares de marcaje. Los resultados se muestran en las Tabla 20a - d.

Tabla 20a: Análisis de células CD34+ en muestras de médula ósea marcadas a 20, 40 y 80 x 10⁶ células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			40 x 10 ⁶			80 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC1	0.47	4672	4.40	0.49	5035	4.22	0.52	5370	2.92
CNC2	0.27	496	10.48	0.27	502	2.40	0.26	478	5.44
CNC3	0.32	729	3.13	0.34	779	0.12	0.40	923	1.46
CNC4	0.29	662	2.48	0.31	724	2.32	0.28	661	5.05
CNC5	1.07	2658	3.32	ND	ND	ND	1.40	2638	5.44
CNC6	1.00	9625	4.74	1.10	11532	2.73	1.11	11722	2.26
CNC7	1.14	2583	4.96	ND	ND	ND	1.42	3294	9.49
CNC8	0.42	3295	5.00	0.49	3795	1.19	0.50	3872	2.29
CNC9	3.30	26395	0.93	3.34	27633	3.08	3.41	28050	1.34
CNC10	1.00	2555	2.83	0.94	2358	0.10	0.94	2323	0.76
CNC11	1.08	6068	3.21	1.15	6236	6.44	1.18	6440	2.30
CNC12	0.40	621	5.37	0.40	598	1.30	0.43	641	6.58
CNC13	0.37	941	8.56	0.47	1194	6.02	0.54	1350	6.61
CNC14	0.63	1374	8.98	0.72	1571	5.89	0.77	1624	5.51
CNC15	2.16	4791	3.61	2.53	5525	0.84	2.53	5568	1.12
CNC16	0.31	841	6.96	0.39	1052	1.84	0.40	1082	1.79
CNC17	0.38	983	11.16	ND	ND	ND	0.46	1195	3.07
Mediana (Rango)	0.47 (0.27-3.3)	2555 (496-26395)	4.74 (0.93-11.16)	0.49 (0.27-3.34)	1965 (502-27633)	2.36 (0.1-6.44)	0.54 (0.26-3.41)	2323 (478-28050)	2.92 (0.76-9.49)

20, 40 y 80 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de células CD34⁺ en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de célula CD34⁺. CV, coeficiente de variación del porcentaje. ND, no determinado.

Tabla 20b: Análisis de linfocitos B en muestras de médula ósea marcadas a 20, 40 y 80 x 10⁶ células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			40 x 10 ⁶			80 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC1	0.07	731	7.87	0.08	838	1.30	0.10	1014	10.00
CNC2	0.43	802	1.63	0.41	772	1.70	0.41	752	1.70
CNC3	3.73	8367	2.49	3.83	8640	1.31	3.98	9034	3.82
CNC4	0.31	723	2.24	0.32	745	8.84	0.32	754	0.60
CNC5	8.33	20474	2.04	ND	ND	ND	8.08	20191	1.84
CNC6	4.24	40635	3.74	4.70	49055	2.47	5.05	52878	1.69
CNC7	3.05	6776	1.62	ND	ND	ND	3.37	7668	4.20
CNC8	1.30	10223	2.66	1.71	13165	2.53	1.72	13167	2.06
CNC9	9.21	72492	1.96	9.41	76721	1.75	9.98	80790	1.36
CNC10	0.54	1354	2.12	0.61	1497	1.17	0.61	1494	11.59
CNC11	1.80	9838	4.48	1.92	10405	2.27	1.93	10535	3.24
CNC12	0.10	139	7.44	0.09	127	8.71	0.10	136	12.22
CNC13	0.67	1669	7.44	0.73	1824	8.78	0.96	2354	12.50
CNC14	1.30	2795	5.44	1.44	3105	1.47	1.59	3246	2.67
CNC15	0.70	1523	2.02	0.85	1819	6.66	0.87	1883	1.63
CNC16	0.67	1816	4.22	0.90	2413	0.60	1.01	2717	0.70
CNC17	0.16	407	4.56	ND	ND	ND	0.21	544	1.20
Mediana (Rango)	0.7 (0.07-9.21)	1816 (139-72492)	2.66 (1.62-7.87)	0.88 (0.08-9.41)	2119 (127-76721)	2.01 (0.6-8.84)	1.01 (0.1-9.98)	2717 (136-80790)	2.06 (0.6-12.5)

20, 40 y 80 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de linfocitos B en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de linfocitos B. CV, coeficiente de variación del porcentaje. ND, no determinado.

Tabla 20c: Análisis de células plasmáticas en muestras de médula ósea marcadas a 20, 40 y 80 x 10⁶ células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			40 x 10 ⁶			80 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC1	0.14	1300	8.68	0.14	1508	3.93	0.17	1603	0.20
CNC3	0.25	559	6.93	0.28	621	7.52	0.29	658	5.51
CNC4	0.52	1206	1.35	0.55	1278	2.44	0.58	1366	7.71
CNC5	0.23	558	0.50	ND	ND	ND	0.21	534	6.73
CNC6	0.12	1100	4.93	0.13	1418	4.34	0.15	1538	3.93
CNC7	0.38	853	1.84	ND	ND	ND	0.45	1030	3.14
CNC8	1.35	10590	4.47	1.59	12229	1.66	1.75	13413	3.24
CNC9	0.02	121	10.7	0.01	121	12.30	0.02	124	9.80
CNC10	0.45	1134	1.20	0.54	1343	7.86	0.57	1405	2.48
CNC11	0.50	2710	6.47	0.54	2945	3.83	0.58	3199	3.57
CNC12	3.32	5013	5.11	3.71	5373	0.95	3.74	5502	2.65
CNC13	0.09	231	9.80	0.10	255	11.2	0.12	290	6.15
CNC14	0.11	232	10.40	0.12	246	6.15	0.11	218	6.73
CNC15	0.53	1140	4.04	0.72	1549	1.96	0.76	1643	5.58
CNC16	0.07	198	10.60	0.09	234	8.32	0.09	253	10.70
CNC17	0.26	657	0.10	ND	ND	ND	0.27	694	0.11
Mediana (Rango)	0.25 (0.02-3.32)	976 (101-10590)	5.02 (0.1-10.7)	0.28 (0.01-3.71)	1343 (121-12229)	4.34 (0.95-12.3)	0.28 (0.02-3.74)	1198 (124-13413)	4.72 (0.11-10.7)

20, 40 y 80 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de células plasmáticas en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de célula plasmática. CV, coeficiente de variación del porcentaje. ND, no determinado.

Tabla 20d: Análisis de linfocitos T CD4⁺ en muestras de médula ósea marcadas a 20, 40 y 80 x 10⁶ células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			40 x 10 ⁶			80 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC1	1.32	12669	2.32	1.29	13036	2.05	1.38	13999	0.42
CNC2	1.61	2925	6.61	1.59	2968	1.33	1.45	2640	2.93
CNC3	10.16	22766	0.50	10.03	22617	0.49	10.13	23023	1.20
CNC4	2.59	5961	0.55	2.64	6140	2.68	2.64	6225	0.32
CNC5	1.63	4018	1.30	ND	ND	ND	1.62	4037	0.44
CNC6	4.82	46138	2.28	4.94	51649	0.54	5.04	52833	0.34
CNC7	5.68	12610	0.62	ND	ND	ND	5.71	13006	0.12
CNC8	2.17	17094	0.80	2.14	16468	0.71	2.13	16327	0.27
CNC9	2.26	17830	1.99	2.21	18006	1.89	2.29	18513	1.54
CNC10	6.05	15170	0.58	6.29	15535	2.25	6.28	15480	3.94
CNC11	2.96	16174	3.00	2.95	15987	1.19	3.00	16376	0.33
CNC12	2.61	3939	0.81	2.62	3796	0.27	2.63	3868	3.23
CNC13	5.40	13552	2.49	5.57	14015	3.30	6.02	14892	4.46
CNC14	4.40	9464	2.09	4.60	9876	2.27	4.68	9558	1.84
CNC15	1.61	3506	1.14	1.68	3605	2.42	1.75	3784	1.68
CNC16	2.47	6687	2.29	2.75	7406	3.34	2.89	7759	0.49
CNC17	2.57	6564	9.92	ND	ND	ND	2.76	7120	5.89
Mediana (Rango)	2.59 (1.32-10.16)	12610 (2925-46138)	1.99 (0.5-9.92)	2.7 (1.29-10.03)	13525 (2968-51649)	1.97 (0.27-3.34)	2.76 (1.38-10.13)	13006 (2640-52833)	1.2 (0.12-5.89)

20, 40 y 80 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de linfocitos T CD4⁺. CV, coeficiente de variación del porcentaje. ND, no determinado.

2.1.4.1. Análisis de precisión

Se calculó el coeficiente de variación (CV) del porcentaje obtenido para cada subpoblación en cada muestra a cada una de las concentraciones celulares de marcaje (Tabla 20a - d). Como era de esperar, se observaron mayores CV para las poblaciones celulares de menor tamaño, estando siempre por debajo del 12,5%.

Se compararon los CV de cada población a las tres concentraciones celulares de marcaje, no observándose diferencias significativas en ninguna de las cuatro poblaciones celulares analizadas (test de Friedman NS; test de Wilcoxon NS, comparando los CV obtenidos a la concentración estándar de 20 millones con los obtenidos a cada una de las otras dos concentraciones).

2.1.4.2. Análisis de exactitud

Con respecto a la influencia de la concentración celular de marcaje sobre la exactitud de los resultados, se compararon los porcentajes obtenidos con las 3 concentraciones utilizadas (Tabla 20a - d).

Se observó un aumento significativo del porcentaje de células CD34⁺, LB y CP al marcar a 40 mill cel/mL en relación al marcaje estándar a 20 mill cel/mL. Este efecto se intensificó a 80 mill cel/mL, afectando también a linfocitos T CD4⁺ (Tabla 21).

Los incrementos observados en los porcentajes de células CD34⁺, LB y CP se situaron en torno al 10% para una concentración de marcaje de 40 mill cel/mL, y al 21% para 80 mill cel/mL. En el caso del porcentaje de LT CD4⁺ se observó un incremento del 5% al marcar a 80 mill cel/mL.

Tabla 21: Análisis comparativo de los porcentajes obtenidos para cada población celular a las tres concentraciones de marcaje.

	Friedman	Wilcoxon	
		20 vs 40	20 vs 80
Células CD34⁺	0.004	0.008	0.001
Linfocitos B	0.0001	0.003	0.003
Células plasmáticas	0.0001	0.004	0.002
Linfocitos T CD4⁺	0.045	NS	0.011

Se muestra el valor de la p.

20, 40 y 80, concentración celular de marcaje expresada en millones de células/mL.

Analizando el número de eventos de cada población, se comprobó que el incremento observado en el porcentaje de las distintas poblaciones se debía a un incremento en el número de eventos detectados de cada población, para un mismo número de leucocitos adquiridos (Tabla 22).

Tabla 22: Análisis comparativo del número de eventos detectado para cada población celular a las tres concentraciones de marcaje.

	Friedman	Wilcoxon	
		20 vs 40	20 vs 80
Leucocitos	NS	NS	NS
Células plasmáticas	< 0.001	0.002	0.001
Linfocitos B	0.001	0.002	0.002
Células CD34⁺	0.005	0.006	0.003
Linfocitos T CD4⁺	0.03	NS	0.011

Se muestra el valor de la p.

20, 40 y 80, concentración celular de marcaje expresada en millones de células/mL.

2.2. Comparación de marcaje a 20 y 30 millones de células/mL

Puesto que una concentración de marcaje de 40 mill cel/mL afecta significativamente a los resultados, exploramos la posibilidad de aumentar la concentración estándar de 20 a 30 mill cel/mL. Se marcaron 10 muestras de médula ósea a ambas concentraciones celulares con el mismo planteamiento desarrollado hasta el momento: cada muestra se marcó por triplicado a cada una de las dos concentraciones, adquiriéndose el mismo número de leucocitos (test de Wilcoxon NS) (Tabla 23) y analizándose las mismas cuatro poblaciones (Tabla 24a - d).

Tabla 23: Número de leucocitos adquiridos a cada una de las dos concentraciones celulares de marcaje.

Muestra	20 x 10 ⁶	30 x 10 ⁶
CNC18	268,650	270,650
CNC19	213,150	215,350
CNC20	230,180	230,910
CNC21	216,610	215,360
CNC22	186,630	185,530
CNC23	205,260	203,810
CNC24	239,360	238,390
CNC25	203,380	199,080
CNC26	171,180	170,850
CNC27	457,883	457,683
Mediana	239,228	215,355
(Rango)	(171,180 - 457,883)	(170,850 - 457,683)

20 y 30 x 10⁶ células/mL. Cada uno de los valores corresponde a la media de 3 determinaciones.

Análogamente a lo realizado anteriormente, se compararon los CV de cada análisis realizado a las dos concentraciones de marcaje, no observándose diferencias significativas (test de Wilcoxon NS). Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de las cuatro poblaciones, obtenido a las dos concentraciones de marcaje (test de Wilcoxon NS).

Tabla 24a: Análisis de células CD34+ en muestras de médula ósea marcadas a 20 y 30 millones de células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			30 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC18	0.53	1425	4.71	0.57	1550	2.66
CNC19	1.29	2752	8.96	1.34	2876	6.71
CNC20	1.13	2608	2.69	1.14	2635	4.97
CNC21	1.30	2822	4.36	1.32	2858	5.85
CNC22	2.47	4581	1.67	2.50	4634	3.81
CNC23	1.67	3428	0.35	1.65	3368	3.15
CNC24	0.67	1605	5.97	0.63	1491	3.32
CNC25	0.76	1533	1.53	0.76	1516	2.0
CNC26	1.50	2563	5.03	1.48	2524	6.95
CNC27	0.13	574	4.56	0.12	540	0.10
Mediana (Rango)	1.21 (0.13-2.47)	2585 (574-4581)	4.46 (0.35-8.96)	1.23 (0.12-2.5)	2579 (540-4634)	3.56 (0.1-6.95)

20 y 30 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de células CD34⁺ en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de célula CD34⁺. CV, coeficiente de variación del porcentaje.

Tabla 24b: Análisis de linfocitos B en muestras de médula ósea marcadas a 20 y 30 millones de células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			30 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC18	0.70	1891	2.17	0.70	1902	3.58
CNC19	2.51	5317	2.43	2.58	5558	2.16
CNC20	4.25	9724	1.49	4.39	10377	1.59
CNC21	1.32	2867	2.18	1.32	2852	0.87
CNC22	1.18	3343	2.55	1.91	3548	1.09
CNC23	2.58	5298	3.10	2.53	5153	1.05
CNC24	0.84	2009	4.12	0.83	1984	1.39
CNC25	0.53	1088	2.86	0.53	1069	2.15
CNC26	3.50	5986	2.70	3.47	5925	2.68
Mediana (Rango)	1.32 (0.53-4.25)	3343 (1088-9724)	2.55 (1.49-4.12)	1.91 (0.53-4.39)	3548 (1069-10377)	1.59 (0.87-3.58)

20 y 30 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de linfocitos B en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de linfocitos B. CV, coeficiente de variación del porcentaje.

Tabla 24c: Análisis de células plasmáticas en muestras de médula ósea marcadas a 20 y 30 millones de células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			30 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC18	0.057	113	12.2	0.043	124	11.09
CNC19	2.60	5532	5.78	2.62	5651	1.91
CNC20	0.18	416	8.33	0.18	413	5.56
CNC22	0.18	331	5.56	0.16	310	3.53
CNC23	0.09	183	6.66	0.08	171	6.93
CNC24	0.04	89	0.12	0.03	78	11.3
CNC25	0.20	402	5.0	0.19	382	3.0
Mediana (Rango)	0.18 (0.04-2.60)	331 (89-5532)	5.78 (0.12-12.2)	0.16 (0.03-2.62)	310 (78-5651)	5.56 (1.91-11.3)

20 y 30 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de células plasmáticas en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de célula plasmática. CV, coeficiente de variación del porcentaje.

Tabla 24d: Análisis de linfocitos T CD4⁺ en muestras de médula ósea marcadas a 20 y 30 millones de células/mL.

Muestra	20 x 10 ⁶			30 x 10 ⁶		
	%	Eventos	CV	%	Eventos	CV
CNC18	2.0	5338	1.33	2.0	5377	1.33
CNC19	9.06	19310	1.16	9.22	19839	1.56
CNC20	2.43	5588	0.63	2.49	5742	0.70
CNC21	5.23	11324	1.15	5.30	11433	0.89
CNC22	3.44	6396	0.77	3.40	6308	1.76
CNC23	2.11	4331	1.71	2.12	4318	0.82
CNC24	2.73	6529	0.76	2.72	6476	0.56
CNC25	4.56	9284	0.99	4.50	8959	0.45
CNC26	4.14	7095	1.81	4.15	7086	1.05
Mediana (Rango)	3.44 (2.0-9.06)	6529 (4331-19310)	1.15 (0.63-1.81)	3.60 (2.0-9.22)	6696 (4318-19839)	0.89 (0.45-1.76)

20 y 30 x 10⁶, células/mL. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. %, porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el total de leucocitos. Eventos, número de eventos detectados con fenotipo de linfocitos T CD4⁺. CV, coeficiente de variación del porcentaje.

3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA MUESTRA

3.1. Desarrollo de un sistema que evalúe el grado de hemodilución de una muestra de médula ósea.

Un factor limitante a la hora de realizar estudios de alta sensibilidad en muestras de médula ósea es la posible presencia de hemodilución. Durante la extracción de médula ósea se realizan dos aspirados; el primero se utiliza en el estudio morfológico y el segundo, con menos espículas de tejido hematopoyético y más sangre periférica, para los estudios inmunofenotípicos (Bain 2001; Westers et al. 2012). Con el fin de establecer un sistema que cuantifique el grado de hemodilución de las muestras de MO, se analizó el porcentaje de células CD34⁺, de células plasmáticas y de neutrófilos tal como se explica en el apartado 5.2 de Material y métodos (página 45).

Se analizaron 122 muestras de MO no afectas de enfermedad hematológica. Los resultados se muestran en la Tabla 25. Aquellas que mostraban un aumento en el porcentaje de CD10 y una disminución en el de CD34 y células plasmáticas con respecto a los valores normales del laboratorio (y de acuerdo con la literatura) (Ocqueteau et al. 1998; Sandes et al. 2013) se consideraron contaminadas con SP (muestras BM96-122).

Tabla 25: Parámetros analizados para evaluar contaminación con sangre periférica en muestras de médula ósea.

Muestra	Concentración	CD34 ⁺ (%)	CP (%)	CD10 ⁺ (%)	Contam
BM1	13.33	0.38	0.20	43.44	No
BM2	9.31	0.43	0.11	53.00	No
BM3	13.42	0.47	0.12	60.22	No
BM4	20.63	0.17	0.30	67.00	No
BM5	21.43	0.80	0.42	33.58	No
BM6	42.50	1.07	0.28	37.67	No
BM7	12.41	0.40	0.10	43.46	No
BM8	27.74	0.72	0.11	49.72	No
BM9	29.44	1.50	0.07	43.23	No
BM10	20.71	1.01	0.21	36.56	No
BM11	29.94	0.47	0.43	42.44	No
BM12	10.45	1.00	0.08	40.35	No
BM13	20.57	0.50	0.06	50.82	No
BM14	22.35	1.42	0.54	33.23	No
BM15	6.33	0.51	0.53	73.21	No
BM16	20.00	0.90	0.04	36.47	No
BM17	38.71	0.52	0.10	56.26	No
BM18	9.38	0.64	0.10	27.00	No
BM19	9.05	0.75	0.20	64.36	No
BM20	8.35	0.50	0.13	61.40	No

Tabla 25: Continuación

Muestra	Concentración	CD34 ⁺ (%)	CP (%)	CD10 ⁺ (%)	Contam
BM21	27.43	0.36	0.18	67.00	No
BM22	21.98	1.24	0.13	40.43	No
BM23	8.29	0.67	0.08	73.76	No
BM24	31.94	1.25	0.40	33.93	No
BM25	36.36	0.80	0.21	53.00	No
BM26	11.11	0.33	0.24	36.46	No
BM27	13.42	0.68	0.35	61.18	No
BM28	17.00	1.21	0.45	40.52	No
BM29	26.43	0.60	0.22	43.50	No
BM30	21.88	1.02	0.27	42.62	No
BM31	11.32	0.60	0.16	65.14	No
BM32	15.00	0.60	0.04	60.26	No
BM33	9.52	1.27	0.16	42.27	No
BM34	45.83	1.42	0.41	26.65	No
BM35	16.24	1.30	0.25	55.12	No
BM36	35.45	1.12	0.52	30.09	No
BM37	40.65	1.02	0.33	21.63	No
BM38	19.33	0.71	0.30	44.19	No
BM39	11.03	0.57	0.18	59.67	No
BM40	46.00	1.40	0.30	29.00	No
BM41	10.91	0.81	0.22	43.50	No
BM42	10.28	0.80	0.09	67.97	No
BM43	12.67	0.79	0.12	74.51	No
BM44	10.16	0.53	0.13	73.62	No
BM45	12.14	0.81	0.05	69.34	No
BM46	7.09	0.93	0.21	68.71	No
BM47	11.11	0.79	0.13	43.10	No
BM48	6.50	0.29	0.03	46.87	No
BM49	13.60	0.33	0.17	65.40	No
BM50	35.10	0.49	0.09	56.46	No
BM51	4.80	0.23	0.12	38.40	No
BM52	24.44	1.20	0.30	34.42	No
BM53	12.07	0.60	0.02	48.00	No
BM54	11.75	1.40	0.07	64.00	No
BM55	9.39	0.56	0.49	74.14	No
BM56	7.00	0.80	0.11	55.82	No
BM57	14.00	0.99	0.24	46.71	No
BM58	43.48	1.45	0.27	32.39	No
BM59	19.57	1.30	0.14	37.00	No
BM60	7.55	0.92	0.24	32.06	No
BM61	6.00	0.27	0.13	57.53	No
BM62	7.86	1.36	0.26	48.74	No
BM63	14.82	1.00	0.11	58.80	No
BM64	5.06	0.75	0.19	71.66	No
BM65	16.37	0.50	0.11	60.17	No
BM66	32.50	1.23	0.16	32.74	No
BM67	11.81	1.55	0.03	36.00	No
BM68	13.08	0.46	0.23	67.00	No
BM69	17.00	0.73	0.13	81.66	No
BM70	12.09	0.72	0.37	57.18	No
BM71	12.31	1.55	0.40	62.84	No
BM72	38.46	1.02	0.20	39.11	No
BM73	14.96	1.30	0.20	24.79	No
BM74	28.29	1.05	0.13	34.16	No
BM75	16.35	1.52	0.17	38.27	No
BM76	6.50	1.55	0.26	33.40	No
BM77	4.37	1.36	0.26	43.89	No
BM78	8.00	0.22	0.05	57.20	No
BM79	38.00	1.09	0.11	42.40	No
BM80	9.94	1.20	0.60	51.70	No
BM81	13.30	0.70	0.04	51.56	No
BM82	2.57	0.06	0.35	36.94	No

Tabla 25: Continuación

Muestra	Concentración	CD34 ⁺ (%)	CP (%)	CD10 ⁺ (%)	Contam
BM83	15.71	0.56	0.33	61.98	No
BM84	16.85	0.99	0.13	43.34	No
BM85	26.88	1.31	0.19	47.00	No
BM86	10.86	1.49	0.43	41.95	No
BM87	10.63	0.54	0.16	69.11	No
BM88	26.67	0.24	0.07	43.17	No
BM89	18.33	0.64	0.11	56.58	No
BM90	21.60	1.02	0.12	47.76	No
BM91	14.00	0.29	0.07	63.57	No
BM92	7.00	0.27	0.18	69.42	No
BM93	8.40	1.00	0.50	60.09	No
BM94	7.15	0.71	0.14	60.25	No
BM95	11.76	0.42	0.08	62.90	No
BM96	5.42	0.23	0.10	88.56	Sí
BM97	4.70	0.30	0.04	71.00	Sí
BM98	1.39	0.12	0.00	90.45	Sí
BM99	6.46	0.10	0.07	94.03	Sí
BM100	4.91	0.03	0.03	97.00	Sí
BM101	8.00	0.08	0.08	96.00	Sí
BM102	3.38	0.23	0.08	87.40	Sí
BM103	8.77	0.32	0.09	86.34	Sí
BM104	14.81	0.48	0.05	71.58	Sí
BM105	7.97	0.27	0.02	86.30	Sí
BM106	10.83	0.10	0.03	72.03	Sí
BM107	6.40	0.09	0.00	93.35	Sí
BM108	15.56	0.32	0.03	92.99	Sí
BM109	3.35	0.03	0.02	92.49	Sí
BM110	3.79	0.04	0.14	96.68	Sí
BM111	4.20	0.20	0.00	71.50	Sí
BM112	5.28	0.19	0.12	87.92	Sí
BM113	13.93	0.40	0.02	89.34	Sí
BM114	16.67	0.11	0.04	83.19	Sí
BM115	3.75	0.23	0.02	70.00	Sí
BM116	9.00	0.13	0.01	91.15	Sí
BM117	7.34	0.30	0.10	90.14	Sí
BM118	5.33	0.31	0.04	70.78	Sí
BM119	10.71	0.02	0.00	94.00	Sí
BM120	6.00	0.10	0.03	78.00	Sí
BM121	7.71	0.38	0.02	71.05	Sí
BM122	6.50	0.42	0.03	76.44	Sí

Concentración de leucocitos en la muestra medida en 10⁶cels/mL. CD34⁺ (%), porcentaje de células CD34⁺ del total de leucocitos. CP (%), porcentaje de células plasmáticas del total de leucocitos. CD10⁺ (%), porcentaje de células CD10⁺ en la población de granulocitos. Contam, presencia o ausencia de contaminación con sangre periférica.

Se consideran contaminadas las muestras que presentan un aumento del porcentaje de CD10 y una disminución del de CD34⁺ y células plasmáticas con respecto a límites normales

Se realizó un análisis de cluster para comprobar la idoneidad de la clasificación realizada. La Figura 7 muestra el dendrograma obtenido. Se observa cómo las 27 muestras etiquetadas como contaminadas se clasificaron conjuntamente (recuadro gris) en un grupo diferente al resto de las 95 muestras restantes consideradas de buena calidad.

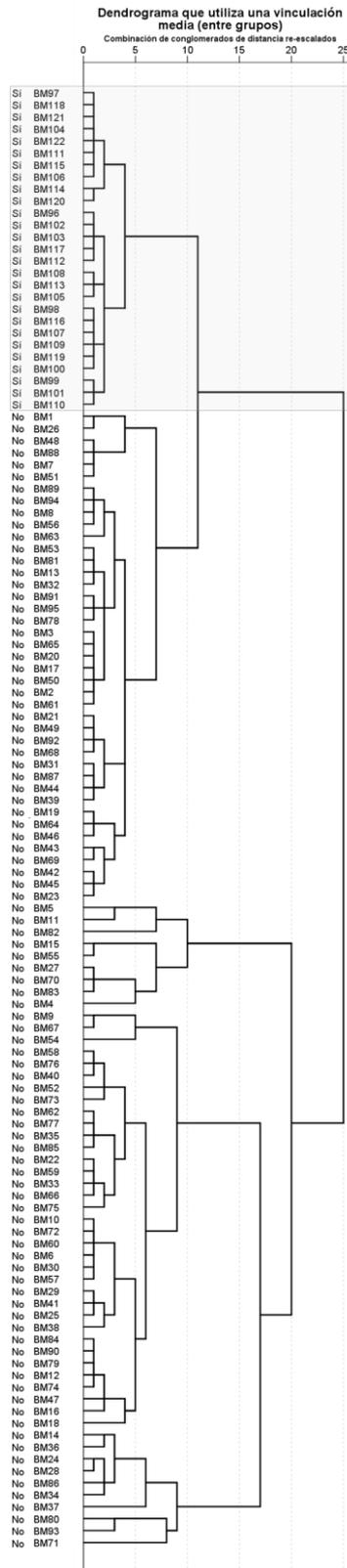


Figura 7: Dendrograma de conglomerados jerárquicos realizado en muestras de MO sin enfermedad hematológica, utilizando como variables los porcentajes de células CD34⁺, células plasmáticas y células CD10⁺. Las 27 muestras con la etiqueta “Sí” se clasifican conjuntamente formando un grupo diferente al resto de muestras.

Por tanto, de las 122 muestras analizadas, 95 correspondían a muestras de buena calidad. Se comprobó que los valores obtenidos en este grupo para las tres variables analizadas correspondían al rango de normalidad del laboratorio. Como era de esperar, las 27 muestras contaminadas presentaron valores significativamente más altos de CD10 y significativamente más bajos de CD34 y células plasmáticas (Figura 8).

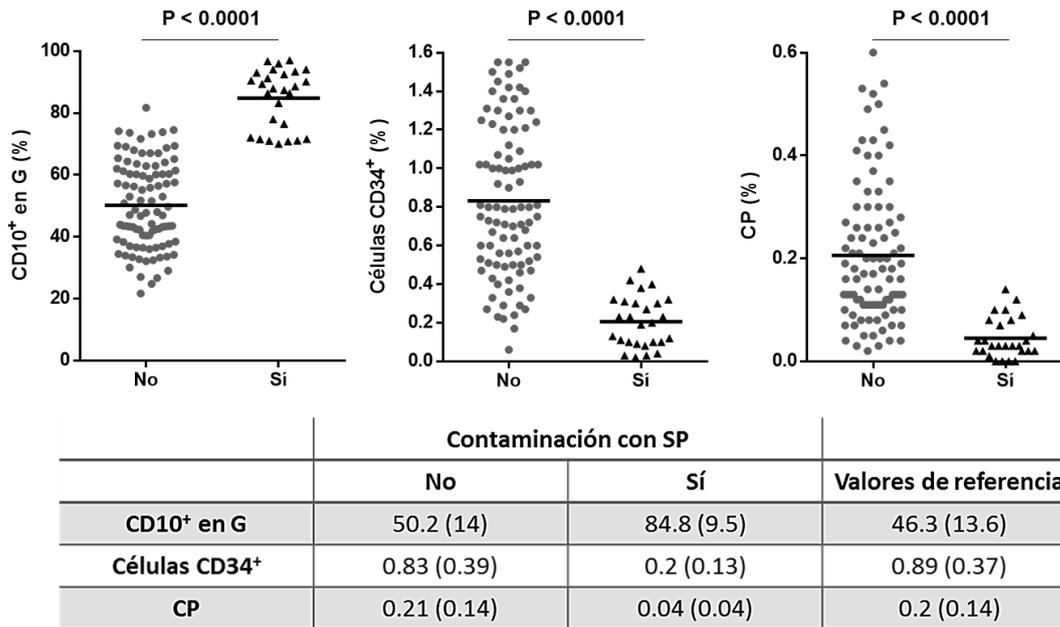


Figura 8: Porcentaje de CD10⁺ en la población de granulocitos (CD10⁺ en G), porcentaje de células CD34 y células plasmáticas en el total de leucocitos en aspirados de MO de individuos sin enfermedad hematológica. Las muestras no contaminadas con SP (n = 95) presentan valores normales para los tres parámetros analizados, mientras que las muestras contaminadas (n = 27) muestran un descenso en los porcentajes de CD34+, CP y un aumento de CD10 en G. La tabla muestra la media, con la desviación típica entre paréntesis.

3.1.1. Concentración leucocitaria en muestras de MO en función de la calidad de la muestra

Las muestras hemodiluidas presentaron una concentración leucocitaria significativamente inferior a las muestras de buena calidad (Figura 9).

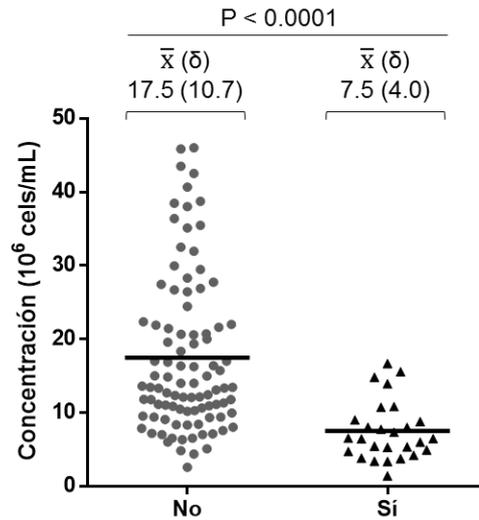


Figura 9: Concentración de leucocitos en muestra de MO clasificadas en función de su contaminación con SP. \bar{x} (σ), media (desviación típica). p, nivel de significación obtenido en la T de Student para comparación de medias. “No”, corresponde al grupo de muestras de buena calidad. “Si”, corresponde al grupo de muestras hemodiluidas.

En este sentido, hay que destacar la correlación significativa existente entre la concentración leucocitaria y las variables que denotan hemodilución. La correlación es positiva con el porcentaje de células CD34⁺ y células plasmáticas, y negativa con el porcentaje de CD10⁺ (Figura 10).

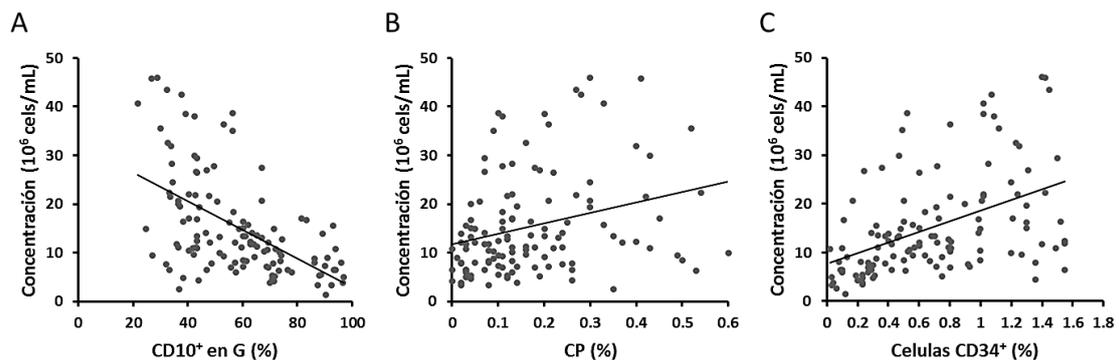


Figura 10: Correlación de Pearson entre concentración leucocitaria y porcentaje de células CD10⁺ en la población de granulocitos (A) (R = -0.55; p < 0.0001), porcentaje de células plasmáticas del total de leucocitos (B) (R = 0.30; p < 0.001), y porcentaje de células CD34⁺ del total de leucocitos (C) (R = 0.46; p < 0.0001) en 122 muestras de MO sin enfermedad hematológica.

3.1.2. Influencia de la calidad de la muestra sobre la disparidad observada entre medulograma y citometría

Se calculó la ratio entre el porcentaje de células plasmáticas determinado en el medulograma (n = 57) y por citometría. En la Figura 11 se observa que la ratio es significativamente mayor en las muestras contaminadas con SP, es decir, el porcentaje de células plasmáticas obtenido por citometría es infraestimado como consecuencia de la hemodilución de las muestras.

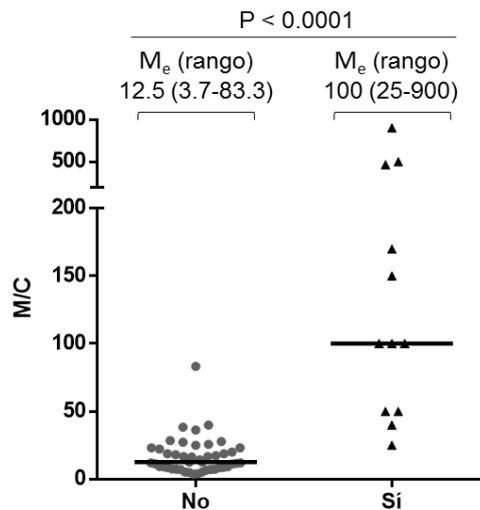


Figura 11: Influencia de la calidad de la muestra sobre la ratio entre el porcentaje de células plasmáticas determinado en el medulograma o por citometría (M/C). “No”, corresponde al grupo de muestras de buena calidad (n = 45). “Sí”, corresponde al grupo de muestras contaminadas con SP (n = 12). M_e (rango), mediana y rango. p, nivel de significación obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

3.1.3. Análisis discriminante de las variables utilizadas para evaluar el grado de contaminación de una muestra de médula ósea con sangre periférica.

Con el objetivo de establecer una función que permita identificar si una muestra de MO está contaminada con SP, así como evaluar su grado de contaminación, se realizó un análisis discriminante utilizando las tres variables citométricas analizadas, y la concentración de leucocitos de la muestra. Los coeficientes estandarizados obtenidos se muestran en la Tabla 26 .

Tabla 26: Coeficientes estandarizados de la función canónica discriminante para las cuatro variables estudiadas

Variables	Coeficientes
CD34 (%)	-0.191
CD10 (%)	0.827
Plasm. (%)	-0.328
Conc	0.061

Conc, concentración de leucocitos (10^6 cels/mL) en la muestra de médula ósea. CD34 (%), porcentaje de células CD34⁺ del total de leucocitos. Plasm (%), porcentaje de células plasmáticas del total de leucocitos. CD10 (%), porcentaje de células CD10⁺ en la población de granulocitos.

Puesto que la concentración leucocitaria se demuestra como una variable de poco peso dentro de la función, se repite el análisis únicamente con las tres variables citométricas, obteniéndose la siguiente función, a la que denominamos ICSP (Índice de contaminación con sangre periférica):

$$\text{ICSP} = - 3.052 + 0.065 \times \% \text{CD10} - 2.008 \times \% \text{Plasm} - 0.609 \times \% \text{CD34}$$

%CD10 es el porcentaje de células CD10⁺ en la población de granulocitos; %CD34 es porcentaje de células CD34⁺ del total de leucocitos; %Plasm es el porcentaje de células plasmáticas del total de leucocitos de la muestra.

3.1.4. Establecimiento de un punto de corte para considerar una muestra hemodiluida.

Como es habitual en las funciones discriminantes, el punto medio entre ambos grupos se eligió como punto de corte. Una muestra de MO cuyos valores para las tres variables analizadas se encuentren en la media de la normalidad presenta un valor de ICSP de -1.0. Una muestra de SP tiene un valor de ICSP de 3.4. La media entre ambos valores (1.2) se consideró el umbral a partir del cual considerar una muestra hemodiluida.

Para comprobar la validez de este punto de corte, se calculó el valor de ICSP de las 122 muestras analizadas. Como se muestra en la Figura 12, todas las muestras contaminadas presentan un valor de ICSP ≥ 1.2 . Con respecto a las muestras no contaminadas sólo una no presenta un ICSP < 1.2 . Se trata de la muestra BM69, cuyos valores de CD34 y células plasmáticas eran normales, mientras que presentaba un porcentaje de CD10 anormalmente aumentado.

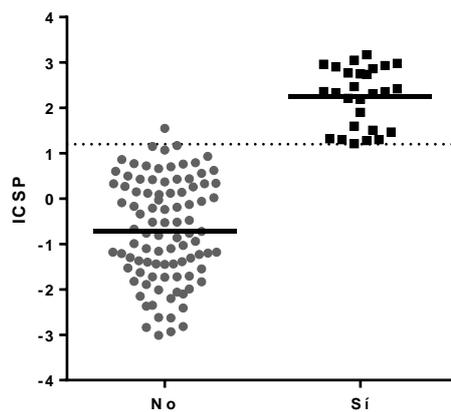


Figura 12: Valores de ICSP (Índice de contaminación con sangre periférica) en muestras de MO sin enfermedad hematológica, clasificadas en función de su grado de hemodilución. “No”, corresponde al grupo de muestras de buena calidad. “Si”, corresponde al grupo de muestras contaminadas con SP. La línea de puntos representa el punto de corte 1.2.

Todas las muestras hemodiluidas ($n = 27$) tenían un valor de ICSP ≥ 1.2 . Todas las muestras de buena calidad, excepto una, tenían valores < 1.2 ($n = 94$). La muestra BM69 presentaba un valor de ICSP de 1.55.

3.1.5. Cantidad de sangre contaminante necesaria para alcanzar el punto de corte establecido.

Quisimos analizar cuánta SP contaminante era necesaria en una muestra de MO para que ésta alcanzara el valor de ICSP de 1.2 y fuera por tanto considerada hemodiluida. Se eligió una muestra de MO de buena calidad (ICSP = -0.06) y se añadieron cantidades crecientes de SP del mismo individuo.

Como se muestra en la Figura 13, el aumento de la presencia de SP en la muestra de MO incrementa progresivamente su valor de ICSP (A) y el porcentaje de células CD10⁺ en G (B), así como disminuye los porcentajes de células CD34⁺ (C) y células plasmáticas (D). Un valor de ICSP de 1.2 corresponde aproximadamente a un 30% de presencia de SP. Un valor de 2 implica que la muestra contiene partes iguales de SP y MO, mientras que 3.4 corresponde a ausencia de MO.

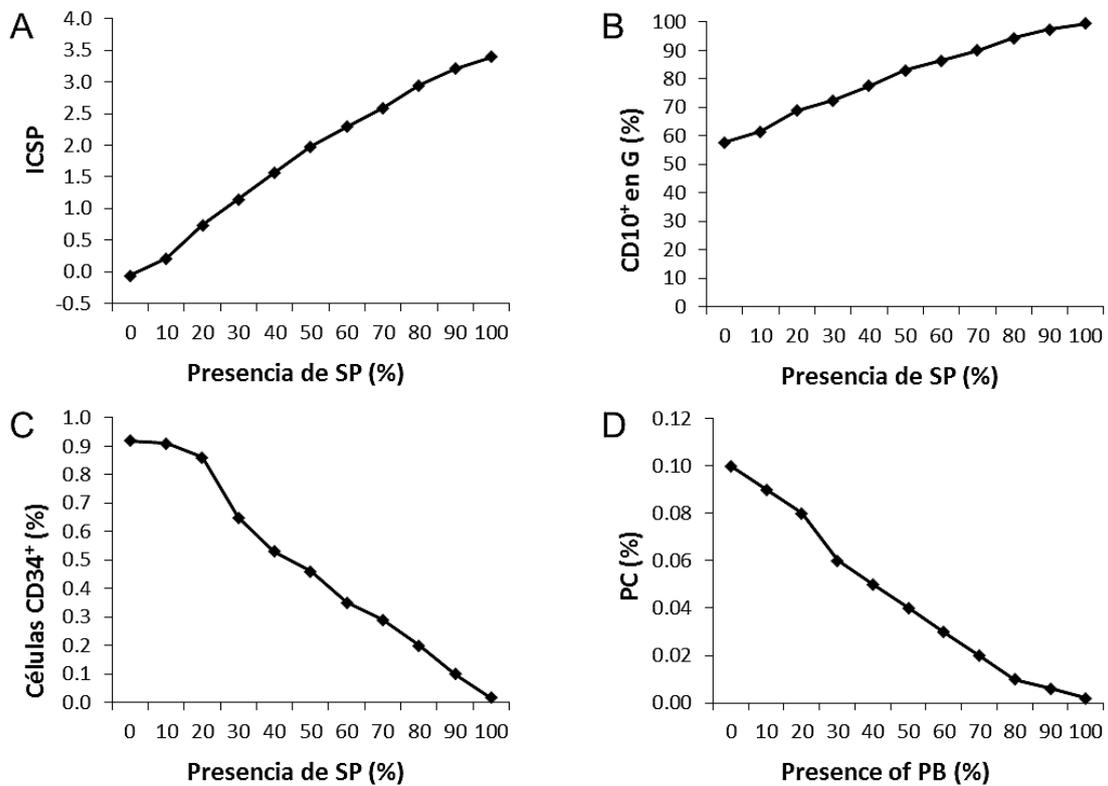


Figura 13: Efecto del aumento progresivo de SP contaminante sobre el valor de ICSP (A), porcentaje de CD10⁺ en granulocitos (B), porcentaje de células CD34⁺ en leucocitos (C) y porcentaje de células plasmáticas en leucocitos (D) de una muestra de MO cuyo valor de ICSP era de -0.06.

3.2. Aplicación del sistema ICSP a muestras patológicas

Para comprobar la validez del sistema ICSP en muestras con infiltración por enfermedad hematológica, se calculó su valor en 89 muestras, descritas en la Tabla 11. Las muestras con infiltración por gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), mieloma múltiple (MM) y síndrome linfoproliferativo crónico B (SLP-B) presentaron un valor de ICSP similar a las 122 médulas normales previamente analizadas (Figura 14). Hay que destacar que el cálculo del valor de ICSP en muestras de pacientes con MGUS y MM se realizó únicamente con los porcentajes de CD10⁺ y CD34⁺, por motivos evidentes. En las muestras de pacientes con SMD no se excluyó ninguna variable para el cálculo de ICSP. Como se observa en la Figura 14, los valores obtenidos fueron significativamente más bajos. Comprobamos que esto se debía a que la enfermedad induce descenso del porcentaje de CD10⁺ ($\bar{x} \pm \delta = 29.5 \pm 17.4$ vs los valores 46.3 ± 13.6) y aumento de los de células CD34⁺ ($\bar{x} \pm \delta = 2.53 \pm 1.76$ vs los valores 0.89 ± 0.37) y CP ($\bar{x} \pm \delta = 0.41 \pm 0.31$ vs los valores 0.2 ± 0.14). Por este motivo, cabe concluir que el sistema ICSP no es válido para muestras con SMD. Fueron excluidas por tanto del resto de análisis.

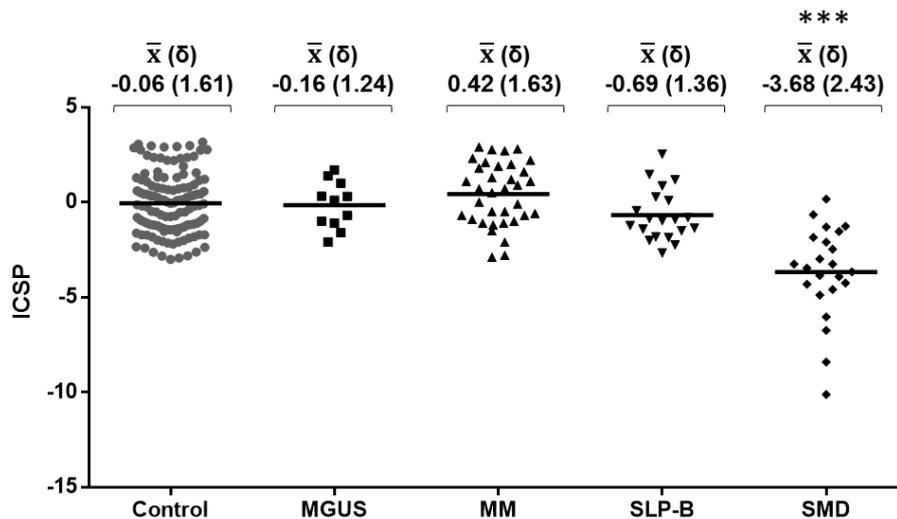


Figura 14: Índice de contaminación con sangre periférica en muestras con infiltración por enfermedad hematológica (gammapatía monoclonal de significado incierto, MGUS (n = 11), mieloma múltiple, MM (n = 35), síndrome linfoproliferativo crónico B, SLP-B (n = 20), síndrome mielodisplásico, SMD (n = 23)), comparadas con las 122 muestras controles previamente analizadas. Las muestras de pacientes con SMD presentan valores significativamente disminuidos de ICSP.

De manera similar a lo realizado anteriormente en muestras normales, se compararon los resultados de CD10⁺, CD34⁺ y CP de las muestras patológicas con los valores de referencia. Diecinueve de las muestras presentaban simultáneamente un aumento del porcentaje de CD10⁺ en G y un descenso del porcentaje de CP y células CD34⁺, constituyendo el grupo de muestras contaminadas con SP. Las 47 muestras restantes se consideraron muestras de buena calidad. El resultado de CP no fue considerado para la clasificación de las muestras de MGUS y MM.

Una vez clasificadas las muestras, se calculó su valor de ICSP. Todas las del grupo de buena calidad (n = 47) presentaron un ICSP < 1.2. Con respecto a las hemodiluidas, todas menos una (n = 18), tenían valores de ICSP ≥ 1.2. La única excepción fue BM141, con un valor de ICSP de 1.1 (Figura 15).

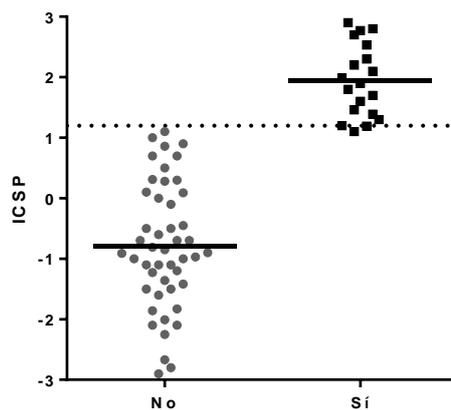


Figura 15: Valor de ICSP en muestras de MO con enfermedad hematológica. “No”, corresponde al grupo de muestras de buena calidad. “Sí”, corresponde al grupo de muestras hemodiluidas.

B. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B

Con el fin de identificar distintas subpoblaciones de linfocitos B a lo largo de su proceso de diferenciación, se analizaron 12 muestras de médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y 10 de bazo (BZ), amígdala (AMG) y ganglio linfático (GL), tal como se describe en Material y Métodos.

Previo al análisis, se evaluó la calidad de las muestras de MO por medio del cálculo de su valor ICSP. Como se muestra en la Tabla 27, dos de las muestras (MO8 y MO10) presentaban un grado de hemodilución superior al punto de corte establecido, por lo que fueron excluidas del análisis inicial.

Tabla 27: Cálculo del índice de contaminación con SP (ICSP) de las muestras analizadas de médula ósea.

Muestra	CD34 ⁺ (%)	CP (%)	CD10 ⁺ (%)	ICSP
MO1	0.13	1.61	55.3	-0.69
MO2	0.09	0.50	68.8	0.94
MO3	0.09	1.21	57.1	-0.26
MO4	0.11	1.20	42.9	-1.21
MO5	0.04	0.82	62.0	0.40
MO6	0.03	0.58	56.6	0.22
MO7	0.04	0.40	56.1	0.27
MO8	0.08	0.43	86.8	2.16
MO9	0.09	1.41	47.6	-1.00
MO10	0.02	0.47	76.7	1.61
MO11	0.02	0.80	69.0	0.90
MO12	0.04	1.27	54.8	-0.34

Porcentaje de células CD34⁺ y células plasmáticas (CP) del total de leucocitos, y porcentaje de células CD10⁺ de la población de granulocitos. Las muestras con un grado significativo de hemodilución (ICSP>1.2) están señaladas en gris y se excluyen del análisis de subpoblaciones.

1. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS

Tal como se explicó en la Introducción, los marcadores que consideramos más relevantes para la identificación de subpoblaciones linfocitarias B son CD38, CD27, CD24, IgM e IgD. Basándonos en el uso de dichos marcadores, combinados con CD19 para selección de linfocitos B y CD3 para exclusión de linfocitos T, desarrollamos una estrategia de análisis secuencial con el software Infinicyt v1.7. La fluorescencia restante se destinó al análisis de otros marcadores, potencialmente útiles para la identificación de subpoblaciones B (CD23, CD10, CD1c, CD21, JAM-C y B220).

1.1. Protocolo de análisis en MO (Figura 16)

a) Selección de población de linfocitos B (Figura 16a), mediante la identificación de células CD19⁺ (Histograma 2) (H2), con tamaño (FSC) y complejidad celular compatible (SSC) (H1), excluyendo eventos CD3⁺ (H2).

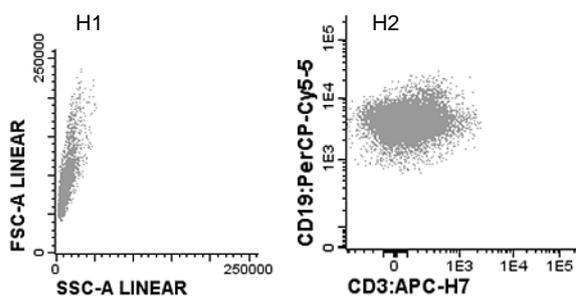


Figura 16a: Selección de población de linfocitos B (gris)

b) Selección de **células plasmáticas** y **plasmablastos** (PL) (Figura 16b): células CD38⁺⁺⁺ CD27⁺⁺ (H2), con tamaño mayor que los linfocitos (H1) (Yoshida et al. 2010). Su expresión de CD24 (H3) e inmunoglobulinas de superficie (H4) es baja (Bemark et al. 2012; Morbach et al. 2010; Perez-Andres et al. 2010).

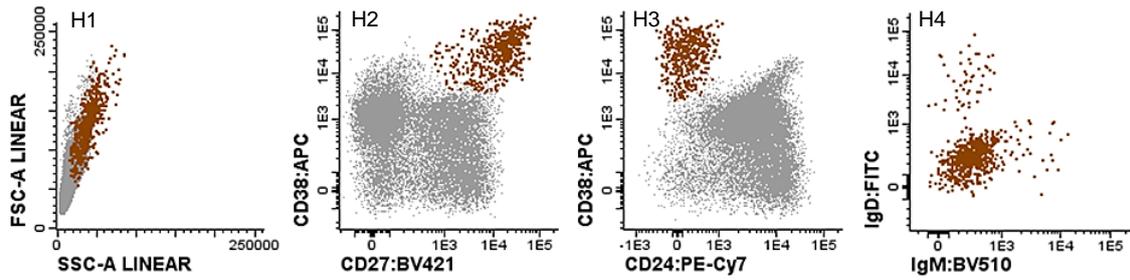


Figura 16b: Selección de células plasmáticas/plasmablastos (PL, marrón).

c) **Precursores B (PREC)** y **linfocitos B inmaduros (INM)** (Figura 16c). En la población restante de linfocitos B, se seleccionaron las células CD38⁺⁺, CD24⁺⁺, IgD⁻ (H1 y 2), correspondientes a células precursoras e inmaduras (Agrawal et al. 2013). A continuación, se diferenció entre células precursoras IgM⁻ (verde) y linfocitos B inmaduros IgM⁺ (amarillo) (H3) (Palanichamy et al. 2009). Se comprobó que ambos estadios expresaban CD10, con mayor intensidad en PREC que en INM (H5), tal como está descrito en la bibliografía (Vaskova et al. 2008). La población PREC mostró una cierta expresión de CD27, también de acuerdo con lo descrito por otros autores (Johnsen et al. 2014; Vaskova et al. 2008).

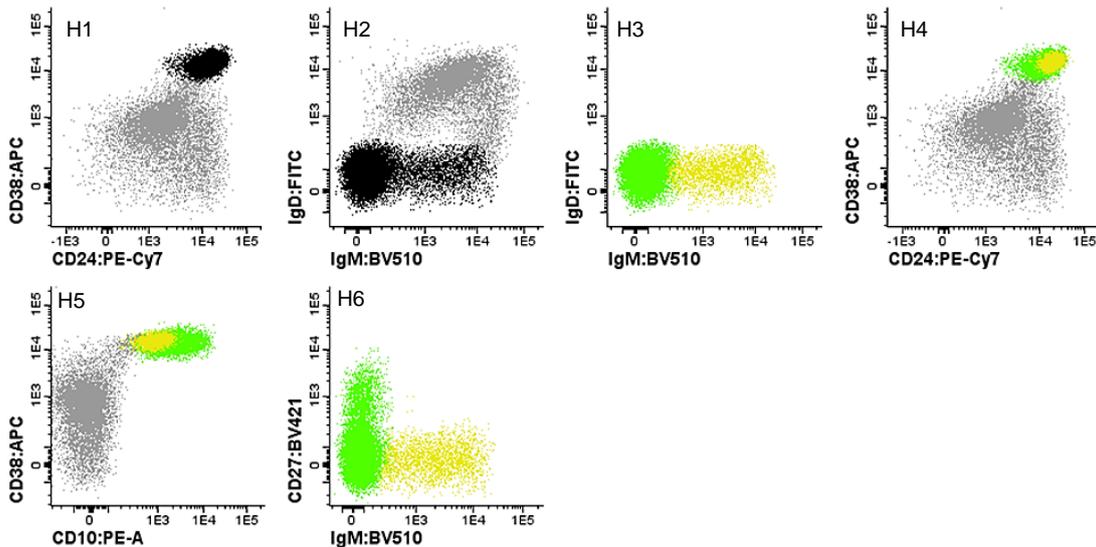


Figura 16c: Selección de células precursoras B (PREC, verde claro) y linfocitos B inmaduros (INM, amarillo).

d) **Linfocitos B memoria CD27⁺, con cambio de isotipo (MS CD27⁺) y sin cambio de isotipo (M-NS CD27⁺)** (Figura 16d). En la población restante de linfocitos B, se seleccionó la población CD27⁺, correspondiente a linfocitos B memoria (H1) (Boldt et al. 2014; Lanzavecchia y Sallusto 2009). Como se observa en H2, incluye células que han realizado cambio de isotipo (IgD⁻, IgM⁻) (MS CD27⁺, azul) y que no lo han realizado (IgD⁺, IgM⁺) (M-NS CD27⁺, rojo) (H3). Se comprobó su elevada expresión de CD24 y su baja expresión de CD38 (H4 y 5) (Buffa et al. 2013; Carsetti, Rosado, y Wardmann 2004; Cuss et al. 2006; Palanichamy et al. 2009).

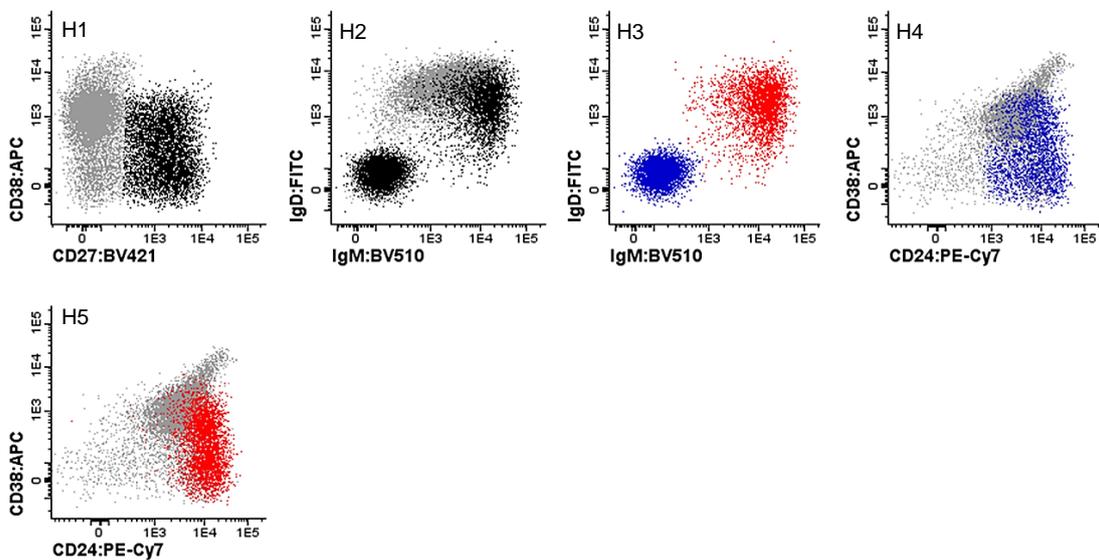


Figura 16d: Selección de linfocitos B memoria CD27⁺, con cambio de isotipo (MS CD27⁺, azul) y sin cambio de isotipo (M-NS CD27⁺, rojo).

e) **Linfocitos B transicionales (T)** (Figura 16e). En la población B restante, CD27⁻, se seleccionaron las células CD38⁺⁺ CD24⁺⁺, correspondientes a LB transicionales (H1). Se comprobó que la expresión de ambas moléculas era inferior a la de los LB inmaduros (H1, Figura 16c) (Palanichamy et al. 2009). Tal como está descrito, los LB transicionales muestran mayor intensidad de IgM que los LB vírgenes (mayoría gris todavía por clasificar) (Agrawal et al. 2013; Palanichamy et al. 2009; Suryani et al. 2010).

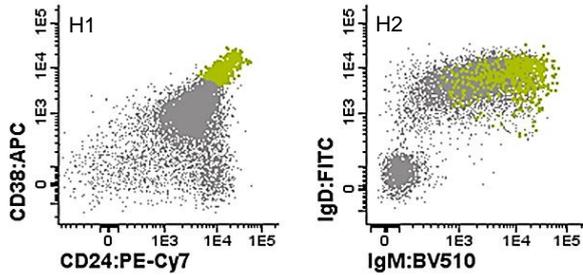


Figura 16e: Selección de linfocitos B transicionales (T, amarillo oscuro).

- f) **Linfocitos B “anérgicos” (ANG)** (Figura 16f). En la población no clasificada, que era $CD27^-$, destacaba una población con expresión homogénea de CD19 con alta intensidad, en ausencia de CD38 y CD24 (H1). Estas características coinciden con las de la población descrita por Wehr et al., caracterizada por su baja expresión de CD21 (Wehr et al. 2004), a la que otros autores atribuyen un comportamiento anérgico (Andrews y Wilson 2010; Charles et al. 2011; Saadoun et al. 2013). Se comprobó su ausencia de expresión de CD21 (H3), así como su patrón de expresión de IgM e IgD, coincidente con lo descrito en la bibliografía (Boldt et al. 2014; Morbach et al. 2010; Saadoun et al. 2013; Wehr et al. 2004).

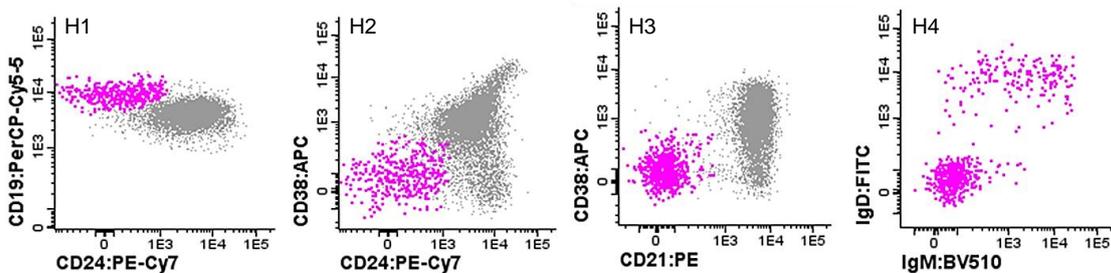


Figura 16f: Selección de linfocitos B anérgicos (ANG, rosa).

- g) **Linfocitos B memoria $CD27^-$ con cambio de isotipo (MS $CD27^-$)** (Figura 16g). En la población restante se identificó una subpoblación minoritaria que había realizado cambio de isotipo, debiendo por tanto corresponder a LB memoria $CD27^-$, cuya existencia está documentada en la bibliografía (Berkowska et al. 2011; Fecteau, Cote, y Neron 2006; Wu, Kipling, y Dunn-Walters 2011).

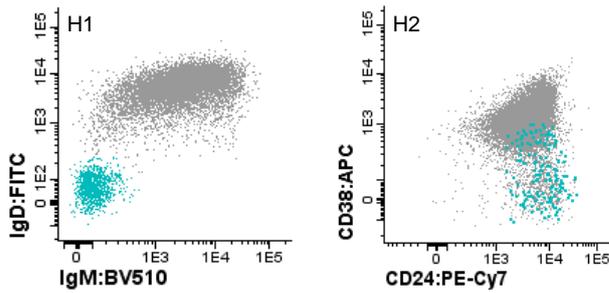


Figura 16g: Selección de linfocitos B memoria $CD27^-$ con cambio de isotipo (MS $CD27^-$, azul turquesa).

h) **Linfocitos B memoria $CD27^-$ sin cambio de isotipo (M-NS $CD27^-$).** (Figura 16h). En la población restante llama la atención la presencia de células en la llamada “región memoria”, descrita como alta expresión de CD24 y baja de CD38 (H2, morado) (Buffa et al. 2013; Carsetti, Rosado, y Wardmann 2004; Cuss et al. 2006; Palanichamy et al. 2009). Es la misma región en que se disponen las subpoblaciones memoria identificadas hasta ahora (MS $CD27^+$, H4 Figura 16d; M-NS $CD27^+$, H5 Figura 16d; MS $CD27^-$, H2 Figura 16g). Los denominamos LB memoria $CD27^-$ sin cambio de isotipo (Weston-Bell et al. 2009).

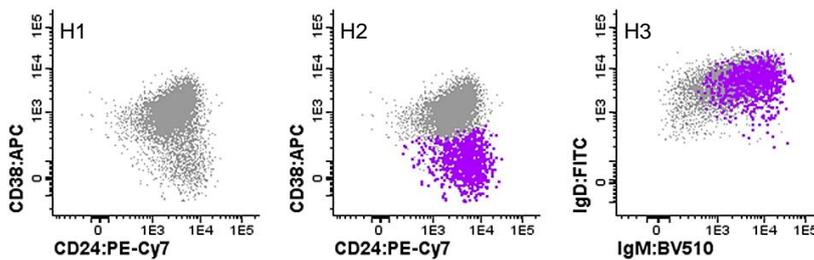


Figura 16h: Selección de linfocitos B memoria $CD27^-$ sin cambio de isotipo (M-NS $CD27^-$, morado).

i) **Linfocitos B vírgenes** (Figura 16i): las células restantes corresponden a linfocitos B vírgenes ($CD38^+ CD24^+ IgM^{+/lo} IgD^+ CD27^-$) (Palanichamy et al. 2009; Perez-Andres et al. 2010).

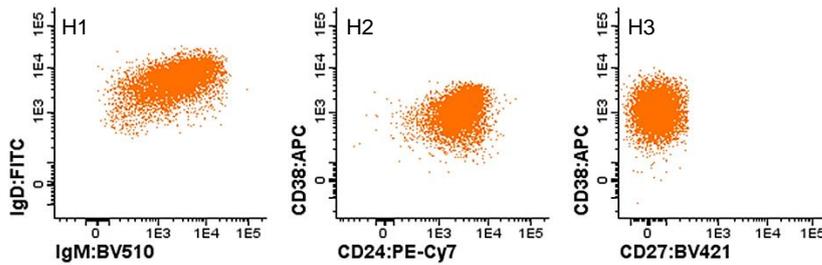


Figura 16i: Selección de linfocitos B vírgenes (naranja).

1.2. Protocolo de análisis en SP.

En muestras de SP se utilizó la misma estrategia de análisis que la descrita para muestras de MO.

1.3. Protocolo de análisis en tejido linfoide

El análisis de linfocitos B en amígdala, ganglio linfático y bazo se realizó de la misma manera que lo descrito hasta ahora, a excepción de los puntos que se detallan a continuación.

- a) Al tratarse de tejido linfoide se requiere de un procesamiento mecánico previo al marcaje, relativamente agresivo para las células. Por ello se utilizó 7-amino-actinomicina D (7-AAD), necesario para excluir eventos apoptóticos (7-AAD^+) que pueden unir inespecíficamente AcMo (Schmid et al. 1992). Debido a que la 7-AAD emite en el mismo canal de fluorescencia que $\text{CD3}^{\text{Percp.Cy5.5}}$ (FL-3), esta combinación junto con FSC-A permite seleccionar el conjunto de leucocitos vivos y excluir simultáneamente linfocitos T (CD3^+) y células muertas 7-AAD^+ (H1, Figura 17a). Adicionalmente para la selección del conjunto de LB se ha utilizado CD20 en lugar de CD19 como se recomienda para este tipo de muestras (Kjeldsen et al. 2011).

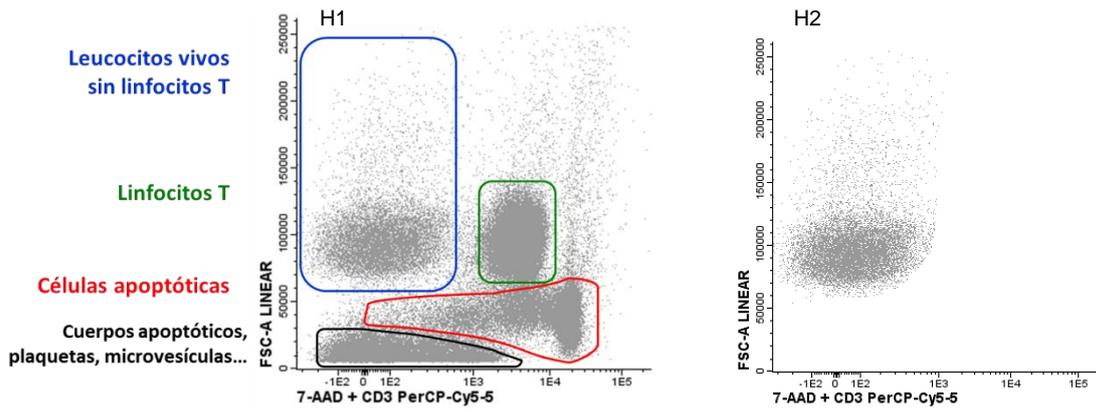


Figura 17a: Selección de leucocitos CD3⁺ y 7-AAD⁻ (gris, H2)

b) **Centro germinal (CG)** (Figura 17b): En amígdala, bazo y ganglio linfático existen células pertenecientes a centro germinal, caracterizadas por su alta expresión de CD38 en ausencia de CD24 (H1, verde) (Giesecke et al. 2014; Palanichamy et al. 2009). Se comprobó su elevada expresión de CD20, su positividad para CD10 y su expresión heterogénea de CD44, características todas ellas propias de dicha población celular (Johnsen et al. 2014; Kjeldsen et al. 2011; Perez-Andres et al. 2010).

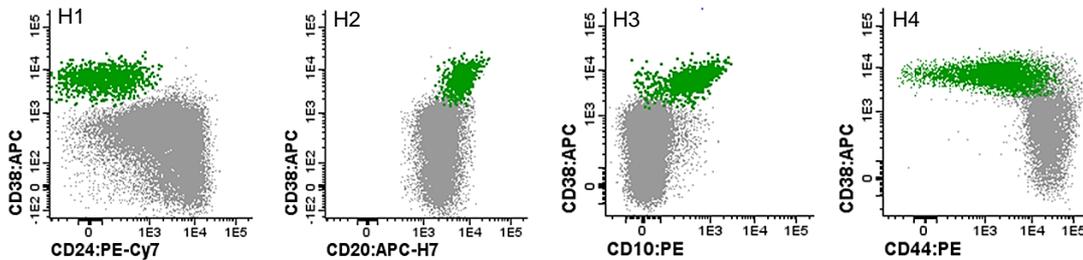


Figura 17b: Selección de células pertenecientes a centro germinal (CG, verde).

2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE SUBPOBLACIONES B

La Figura 18 muestra el patrón de expresión de los marcadores analizados en las once subpoblaciones B identificadas. Ocho de ellas corresponden a linfocitos B de SP (transicionales, vírgenes, memoria CD27 (+/-) con y sin cambio de isotipo y plasmablastos). Las células precursoras e inmaduras se han analizado en MO y el centro germinal en amígdala.

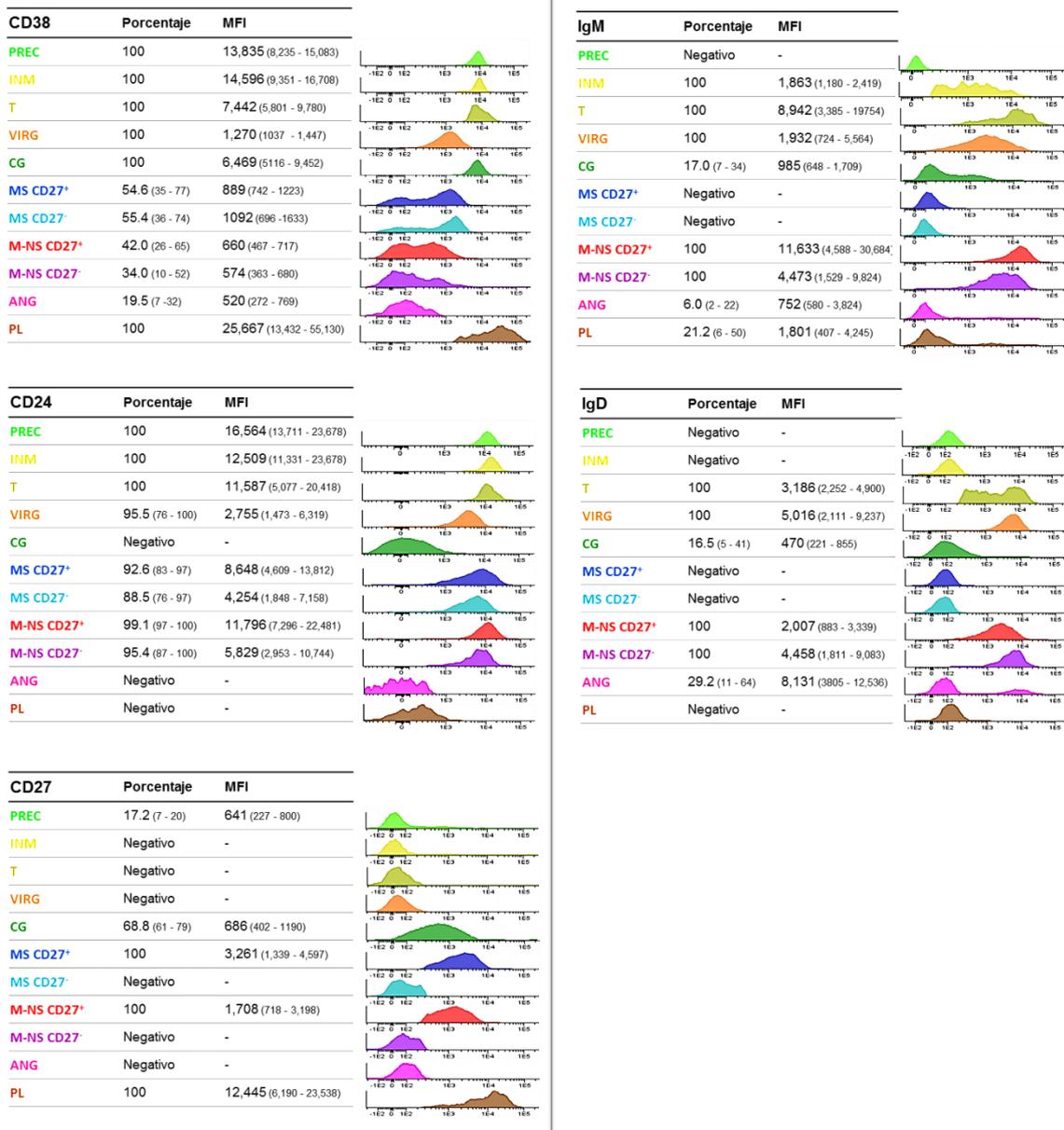


Figura 18: (continua en página siguiente)

Resultados

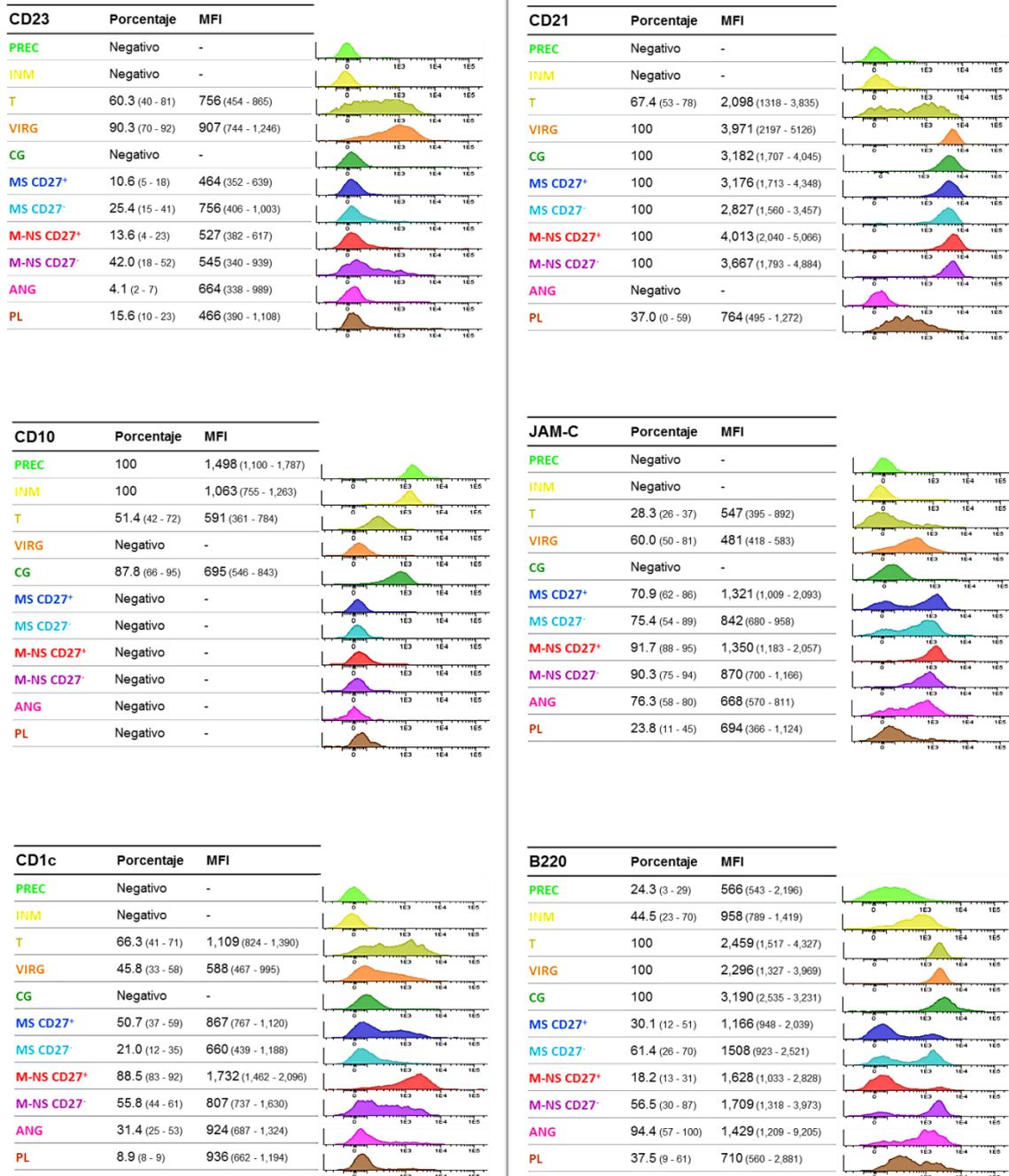


Figura 18 (continuación): Patrón de expresión de las moléculas CD38, CD24, CD27, IgM, IgD, CD23, CD21, CD10, JAM-C, CD1c y B220 a lo largo de la diferenciación B. Se muestran mediana y rango del porcentaje de células positivas para cada marcador en cada subpoblación B, así como su intensidad media de fluorescencia (MFI), que se representa gráficamente a la derecha de la tabla de datos. Las subpoblaciones analizadas corresponden a linfocitos B de SP, excepto precursoras (PREC) e inmaduras (INM), que se han analizado en MO, y centro germinal (CG), analizado en amígdala. T, transicionales. VIRG, vírgenes. CG, centro germinal. MS, LB memoria con cambio de isotipo. M-NS, LB memoria sin cambio de isotipo. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

A continuación se describen las características más relevantes del patrón de expresión de cada uno de los marcadores estudiados (Figura 18):

- **CD38:** alta expresión al inicio de la diferenciación (PREC e INM), disminuyendo en células vírgenes y más todavía en células memoria, llegando a ser prácticamente negativo en ANG. La maduración final a células plasmáticas conlleva su aumento de expresión, siendo máxima en este estadio.
- **CD24:** destaca su negatividad en CG, ANG y PL.
- **CD27:** positivo en gran parte de las células B memoria, y en PL, donde observamos la máxima intensidad.
- **IgM:** su expresión marca el estadio de LB inmaduro (IgM⁺). Es negativa en las células memoria que han realizado cambio de isotipo (MS).
- **IgD:** marca el estadio transicional (IgD⁺) a partir del LB inmaduro (IgD⁻). Por lo demás, presenta un patrón de expresión similar a la IgM.
- **CD21:** negativo en estadios iniciales y finales. Su expresión se inicia en las células transicionales, para hacerse completa en las vírgenes, manteniéndose similar hasta los estadios ANG y PL, en que prácticamente se negativiza.
- **CD10:** alta intensidad en PREC e INM. Expresión en CG, y parcialmente en células transicionales.
- **CD23:** positivo fundamentalmente en células vírgenes, y en menor medida en transicionales
- **CD1c:** negativo en estadios iniciales, finales y en CG, presenta un patrón de expresión variable en el resto de subpoblaciones, siendo las células M-NS CD27⁺ las que presentan mayor porcentaje de expresión (88.5%).
- **JAM-C:** análogamente a CD1c es negativo en estadios iniciales, finales y CG, siendo mayoritariamente positivo en el resto de poblaciones
- **B220:** baja expresión en PREC y en subpoblaciones CD27⁺.

3. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B

La Figura 19 muestra la distribución de subpoblaciones B observada en los distintos tipos de muestra analizadas.



Figura 19: Distribución de subpoblaciones B en muestras de médula ósea (MO), sangre periférica (SP), bazo (BZ), amígdala (AMG) y ganglio linfático (GL). Se representa mediana y rango intercuartílico del porcentaje que representa cada subpoblación del total de linfocitos B. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. CG, centro germinal. MS CD27⁺, LB memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, LB memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, LB memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, LB memoria CD27⁻ sin cambio de isotipo. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, plasmablastos y células plasmáticas.

Como se observa en la Figura 19, las poblaciones B mayoritarias en MO son las células precursoras ($M_e = 30.6\%$) y los LB vírgenes ($M_e = 36.39\%$). Esta última es la población predominante en SP ($M_e = 50.31\%$), seguida por los LB memoria CD27⁺, tanto con cambio de isotipo ($M_e = 15.88\%$) como sin él ($M_e = 19.44\%$). Estas tres subpoblaciones son también las mayoritarias en bazo, aunque sus porcentajes relativos varían con respecto a los de SP ($M_e = 27.9\%$, 32.18% y 24.11% respectivamente). La población predominante en amígdala es CG ($M_e = 41.6\%$), seguido por los LB vírgenes ($M_e = 33\%$). Finalmente en GL la subpoblación mayoritaria son los LB memoria CD27⁺ con cambio de isotipo ($M_e = 55\%$).

Realizando el análisis por subpoblaciones, las células precursoras B están presentes en MO ($M_e = 30.6\%$), no detectándose en ninguna de las muestras analizadas de SP, bazo o ganglio. Llama la atención su presencia en las muestras de amígdala analizadas, aunque en muy bajo porcentaje ($M_e = 0.03\%$), (Tabla 28 y Figura 20).

Los LB inmaduros se encuentran principalmente en MO ($M_e = 4.73\%$), con presencia muy minoritaria en SP ($M_e = 0.02\%$) y AMG ($M_e = 0.01\%$). Por su parte, los LB transicionales muestran presencia significativa en MO ($M_e = 4.65\%$) y SP ($M_e = 3.11\%$), y muy minoritaria en el resto de tejidos.

Tabla 28: Porcentaje de células precursoras e inmaduras referido al total de linfocitos B presentes en las muestras de amígdala.

	PREC (%)	INM (%)
AMG1	0.01	0.00
AMG2	0.11	0.03
AMG3	0.04	0.00
AMG4	0.08	0.01
AMG5	0.01	0.05
AMG6	0.03	0.01
AMG7	0.01	0.00
AMG8	0.01	0.00
AMG9	0.06	0.01
AMG10	0.02	0.01

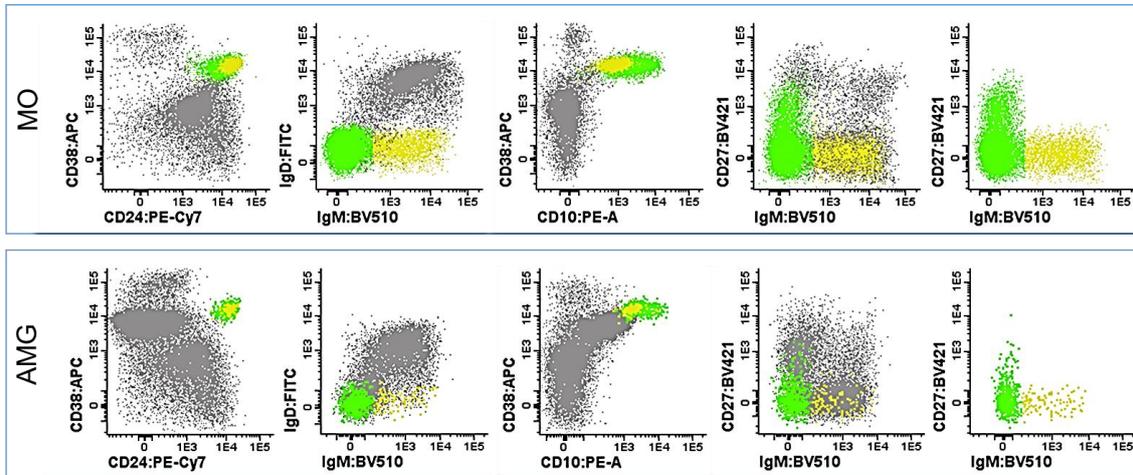


Figura 20: Células precursoras B (verde) e inmaduras (amarillo) dentro de la población de linfocitos B (gris) en muestras de médula ósea (MO) y amígdala (AMG).

Los LB vírgenes están ampliamente representados en todos los tejidos, aunque predominan especialmente en SP (Me = 50.3%, $p = 0.001$). Con respecto a los LB memoria MS CD27⁺, se encuentran principalmente en órganos linfoides secundarios, siendo la población mayoritaria de ganglio (Me = 55.38%). Los LB memoria sin cambio de isotipo (M-NS CD27⁺) se ubican principalmente en SP y bazo (Me = 19.44% y 24.11%, respectivamente).

Finalmente, se detectaron células plasmáticas y plasmablastos en todos los tejidos analizados.

3.1. Influencia de la calidad de la muestra de MO sobre el análisis de distribución de subpoblaciones B

Se analizó la influencia del grado de hemodilución de las muestras de MO analizadas sobre la distribución obtenida de las subpoblaciones B. Los resultados se muestran en la Figura 21.

Se observa una correlación significativa entre el grado de hemodilución de las muestras de MO y los porcentajes obtenidos para las subpoblaciones cuya presencia es significativamente diferente en SP y MO:

- Células precursoras B, ausentes en SP y significativamente presentes en MO ($p < 0.0001$): a medida que el valor de ICSP de las muestras aumenta, desciende el porcentaje de esta población ($R = -0.748$, $p = 0.007$). Un resultado similar, con correlaciones negativas, se obtiene para los LB inmaduros ($R = -0.644$, $p = 0.02$) y células plasmáticas ($R = -0.58$, $p = 0.04$), cuya presencia también es significativamente diferente en MO y SP ($p < 0.0001$ y $p = 0.002$ respectivamente).
- Las tres subpoblaciones memoria significativamente más abundantes en SP que en MO (MS CD27⁺, M-NS CD27⁺, M-NS CD27⁻) ($p = 0.01$, $p = 0.028$ y $p = 0.04$ respectivamente), presentan correlaciones positivas con el grado de hemodilución de la muestra, aumentando su porcentaje en MO a medida que aumenta el valor de ICSP.

El resto de subpoblaciones B (transicionales, anérgicas y MS CD27⁻) no vio afectado su porcentaje en MO en función del grado de hemodilución de la muestra, puesto que su presencia no es significativamente diferente en ambos tejidos. La única excepción la encontramos en el porcentaje de LB vírgenes, que a pesar de ser más abundantes en SP que en MO (50.31% en SP frente a 36.39% en MO, $p = 0.04$) no llega a presentar una correlación significativa con el valor de ICSP.

Resultados

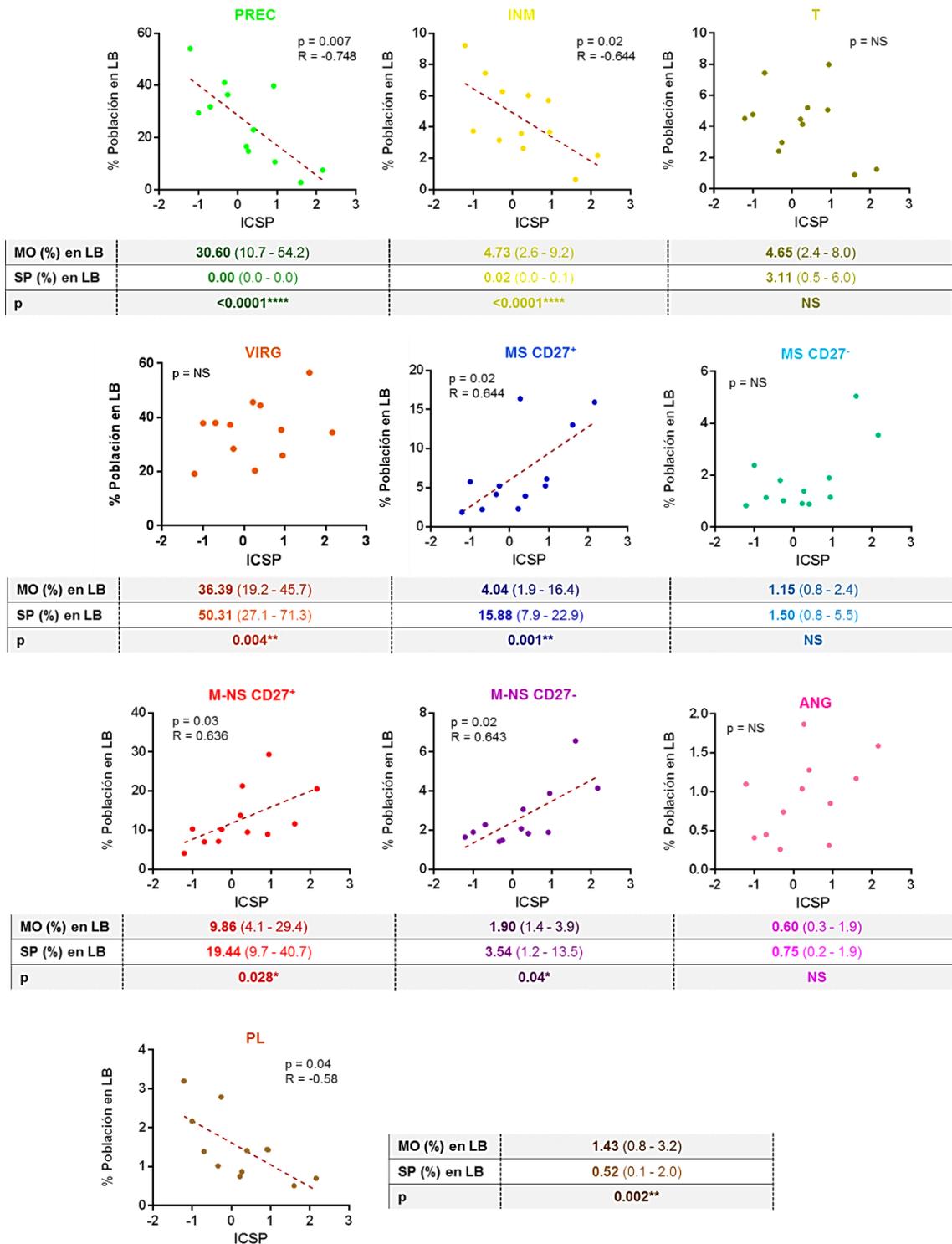


Figura 21: Correlación entre los porcentajes obtenidos para las distintas subpoblaciones B en las 12 muestras de MO analizadas y el grado de hemodilución de cada muestra evaluado como índice ICSP. Debajo de cada gráfica se muestra la comparación de medianas (rango) de los porcentajes de cada subpoblación en MO y SP (U de Mann-Whitney). NS, no significativo. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. CG, centro germinal. MS CD27⁺, LB memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, LB memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, LB memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, LB memoria CD27⁻ sin cambio de isotipo. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, plasmablastos y células plasmáticas.

La Tabla 29 muestra la distribución de subpoblaciones en las dos muestras hemodiluidas que fueron excluidas del análisis. La composición celular de estas muestras se asemeja más a una SP que a una MO.

Tabla 29: Distribución de subpoblaciones B en las dos muestras hemodiluidas que fueron excluidas del análisis.

Subpoblaciones	Valores de referencia en MO	MO8	MO10	Valores de referencia en SP
PREC	30.60 (10.7 - 54.2)	7.43	2.77	0.00 (0.0 - 0.0)
INM	4.73 (2.6 - 9.2)	2.19	0.6	0.02 (0.0 - 0.1)
T	4.65 (2.4 - 8.0)	1.25	0.91	3.11 (0.5 - 6.0)
VIRG	36.39 (19.2 - 45.7)	34.50	56.61	50.31 (27.1 - 71.3)
MS CD27⁺	4.04 (1.9 - 16.4)	15.94	13.2	15.88 (7.9 - 22.9)
MS CD27⁻	1.15 (0.8 - 2.4)	3.55	5.5	1.50 (0.8 - 5.5)
M-NS CD27⁺	9.86 (4.1 - 29.4)	20.6	11.65	19.44 (9.7 - 40.7)
M-NS CD27⁻	1.90 (1.4 - 3.9)	4.15	6.57	3.54 (1.2 - 13.5)
ANG	0.60 (0.3 - 1.9)	1.59	1.17	0.75 (0.2 - 1.9)
PL	1.43 (0.8 - 3.2)	4.7	0.51	0.52 (0.1 - 2.0)

Se representa mediana y rango intercuartílico del porcentaje que representa cada subpoblación del total de linfocitos B. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. CG, centro germinal. MS CD27⁺, LB memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, LB memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, LB memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, LB memoria CD27⁻ sin cambio de isotipo. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, plasmablastos y células plasmáticas.

4. APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B AL CRIBAJE DE SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO CRÓNICO B (SLP-B): UTILIDAD DE LA INCLUSIÓN DE UN MARCADOR DE CG EN EL ANÁLISIS DE TEJIDO LINFOIDE.

El análisis inicial que se realiza a una muestra de tejido linfóide para cribaje de SLP crónico B por citometría incluye invariablemente el estudio de la relación kappa/lambda en la población de linfocitos B. La Tabla 30 muestra los resultados obtenidos en 10 muestras de PAAF correspondientes a áreas hipoecoicas de tiroides, que planteaban diagnóstico diferencial con linfoma.

En todas ellas se observó una alteración tan significativa de la relación kappa/lambda, que en otro tipo de muestra sugeriría fuertemente a priori el diagnóstico de SLP-B

Tabla 30: Relación kappa/lambda en la población de linfocitos B de muestras de PAAF obtenidas a partir de áreas hipoecoicas de tiroides.

Muestra	κ (%)	λ (%)	Ratio (0.8 - 2.2)
TIR1	88.0	12.0	7.3
TIR2	94.5	5.5	17.2
TIR3	2.0	98.0	0.02
TIR4	90.1	9.9	9.1
TIR5	87.8	12.2	7.2
TIR6	90.1	9.9	9.1
TIR7	91.8	8.2	11.2
TIR8	89.2	10.8	8.3
TIR9	87.0	13.0	6.7
TIR10	84.0	16.0	5.25

Los resultados se expresan como porcentajes referidos a la población CD19⁺. Entre paréntesis se muestran los valores de referencia definidos para tejidos linfoides reactivos (Reichard, McKenna, y Kroft 2003).

Al realizar el estudio de subpoblaciones B, se comprobó en todos los casos excepto uno (TIR3), que los linfocitos B clonales presentaban el tamaño celular

y fenotipo característicos de células del centro germinal: CD38^{hi} CD24^{-/+} CD20^{hi} y CD10⁺, con un patrón heterogéneo de expresión de inmunoglobulinas IgD e IgM en superficie. La Figura 22 muestra un ejemplo representativo en que se compara esta población de una de las muestras de tiroides con centro germinal de amígdala normal.

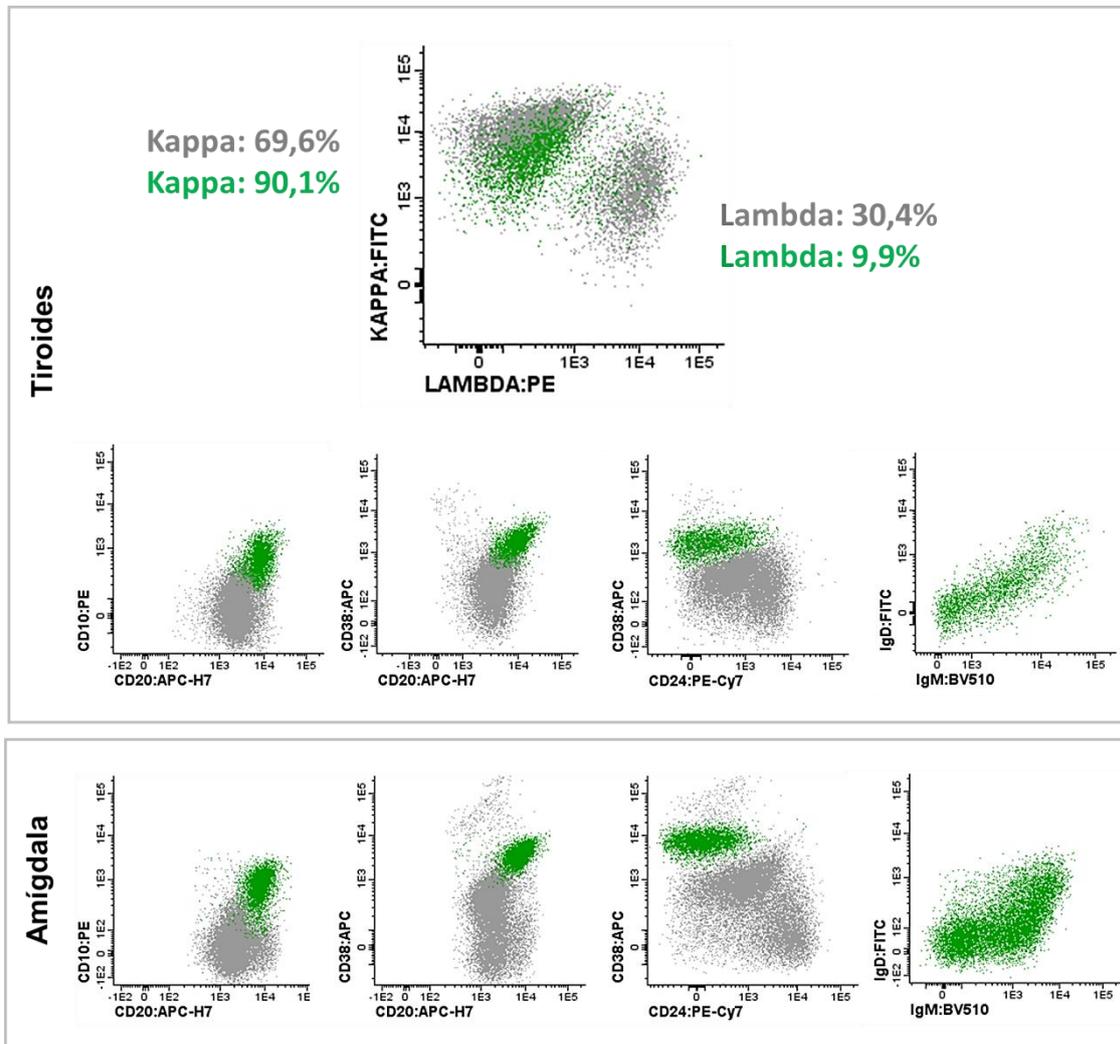


Figura 22: Análisis fenotípico de las células de centro germinal (verde) en la muestra de tiroides TIR6 en comparación con la muestra de amígdala AMG3. En gris se muestran el resto de linfocitos B.

Una vez excluidas las células de centro germinal de cada muestra, se reanalizó la relación Kappa/Lambda en el resto de linfocitos B (Tabla 31).

Tabla 31: Relación kappa/lambda en la población de linfocitos B, excluyendo CG, en muestras de PAAF obtenidas a partir de áreas hipoeoicas de tiroides.

Muestra	LB sin CG			CG (%) en LB
	κ (%)	λ (%)	Ratio (0.8 - 2.2)	
TIR1	60	40	1.50	5,47
TIR2	57.8	42.2	1.37	20,47
TIR3	2.0	98.0	0.02	0
TIR4	68.7	31.3	2.19	16,42
TIR5	56.6	43.4	1.3	29,64
TIR6	57.6	42.4	1.36	13,54
TIR7	63.1	36.9	1.71	40,87
TIR8	68.2	31.8	2.14	28,68
TIR9	59.0	41.0	1.44	9,81
TIR10	57.8	42.2	1.37	11,55

Entre paréntesis se muestran los valores de referencia definidos para tejidos linfoides reactivos (Reichard, McKenna, y Kroft 2003).

Se observa cómo la relación kappa/lambda se normaliza en 9 de las 10 muestras analizadas, si se excluye CG del análisis. Esto significa que la alteración observada en la relación kappa/lambda se debía a la presencia de población clonal kappa⁺ en CG Tal como se describe en Material y Métodos (página 49), las 9 muestras recibieron el diagnóstico final de tiroiditis linfocítica.

La muestra TIR3 presentaba la práctica totalidad del compartimento B (98%) compuesto por células de tamaño muy grande, lambda⁺. Se amplió su estudio fenotípico, obteniendo el patrón característico del Linfoma difuso de Células grandes B, (Figura 23).

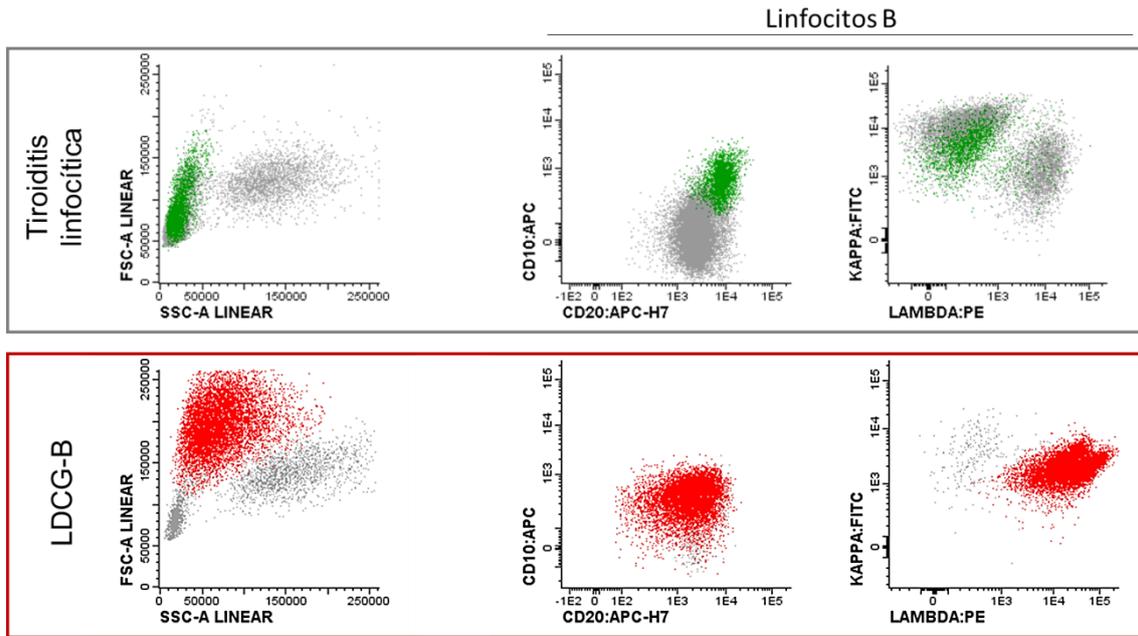


Figura 23: Comparación entre el fenotipo observado en la muestra TIR3, correspondiente a un Linfoma Difuso de células grandes B (rojo) y una muestra representativa de las nueve analizadas con tiroiditis linfocítica, en que la clonalidad se circunscribe a las células de centro germinal (verde).

C. ANÁLISIS DE ALTA SENSIBILIDAD DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B PARA SEGUIMIENTO DE TRATAMIENTO CON RITUXIMAB EN PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES

1. PATRÓN DE RECONSTITUCIÓN B TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE RITUXIMAB

Se estudiaron 72 muestras de sangre periférica de 33 pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con Rituximab. Todas las muestras, se procesaron utilizando la técnica de citometría de alta sensibilidad descrita en Material y Métodos (página 39). En todos los casos se adquirió el mayor nº de leucocitos posible en función de la cantidad de muestra recibida. La sensibilidad alcanzada (para detectar un mínimo de 50 LB) fue de $M_e = 0.0019$ (mínimo = 0.0003, máximo = 0.0106) analizándose un total de leucocitos de $M_e = 2,545,913$ (mínimo = 473,132, máximo = 16,814,910) y linfocitos B de $M_e = 5,570$ (mínimo = 0, máximo = 47,629) (Tabla 32).

En función de los resultados del apartado anterior, se utilizó la combinación de marcadores considerada estructural para el análisis de subpoblaciones B (CD19, CD38, CD24, CD27, IgM e IgD), a la que se añadió CD21 para la identificación de células anérgicas, y CD3 para la imprescindible exclusión de linfocitos T. El resto de marcadores analizados (CD23, CD1c, JAM-C y B221) no demostraron ninguna utilidad superior a la del panel estructural en la identificación de ninguna subpoblación, por lo que ninguno fue incluido.

En primer lugar, se estudió la intensidad y duración de la depleción B obtenida. Para ello, se analizó el número de LB totales y el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento (Figura 24). Basándonos en estudios similares (Dass et al. 2008), consideramos 20 LB/ μ l como umbral de repoblación del compartimento B.

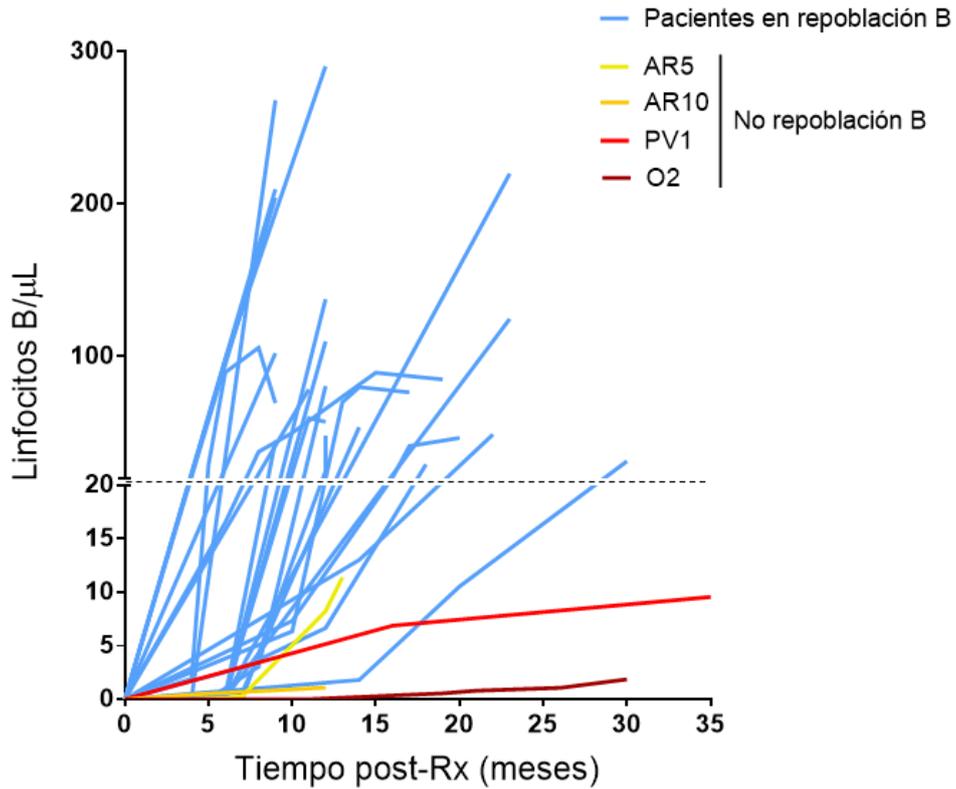


Figura 24: Incremento de linfocitos B por microlitro de sangre en relación al tiempo post-Rituximab medido en meses. Las líneas azules representan los pacientes que han repoblado el compartimento B.

Los pacientes AR10, PV1 y O2 mostraron una repoblación excesivamente demorada o anómala, con valores muy reducidos de LB, más de 12 meses después del inicio del tratamiento, por lo que fueron excluidos del análisis posterior.

Tabla 32: Análisis de subpoblaciones B en muestras post- Rituximab (continúa en la página siguiente)

Muestra	Nº Leuco. analizados	Nº LB analizados	Limite de sensibilidad	Tiempo post-Rx (meses)	LB/µL	Porcentaje de subpoblaciones B										Etapa
						PREC 0.00 (0.0 - 0.0)	INM 0.02 (0.0 - 0.1)	T 3.11 (0.5 - 6.0)	VIRG 50.31 (27.1-71.3)	MS CD27 ⁺ 15.88 (7.9-22.9)	MS CD27 ⁻ 1.50 (0.8- 5.5)	M-NS CD27 ⁺ 19.44 (9.7- 40.7)	M-NS CD27 ⁻ 3.54 (1.2- 13.5)	ANG 0.75 (0.2- 1.9)	PL 0.52 (0.1- 2.0)	
AR1.a	1,875,811	1402	0.0027	10	6.35	0.00	0.00	26.42	1.26	20.13	4.40	4.40	0.00	0.00	43.40	2
AR1.b	1,781,930	20588	0.0028	13	110.92	0.00	0.06	1.90	87.61	2.15	1.03	1.26	2.04	0.73	2.57	4
AR1.c	1,877,842	15911	0.0027	14	55.92	0.00	0.00	1.52	79.30	2.88	1.95	1.63	3.70	1.38	7.27	4
AR1.d	1,698,798	19984	0.0029	17	76.46	0.00	0.00	0.95	86.36	2.20	1.95	0.90	4.88	0.94	1.65	4
AR2.a	9,505,540	1222	0.0005	6	0.73	0.90	3.68	0.00	0.00	8.18	3.36	0.74	0.00	0.00	83.14	1
AR2.b	6,845,792	200	0.0007	4	0.22	2.50	8.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	89.00	1
AR2.c	4,947,181	776	0.001	6	0.99	0.39	1.03	0.00	0.00	2.84	0.00	1.29	0.00	0.00	94.46	1
AR3.a	16,802,217	394	0.0003	5	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	19.54	12.18	0.00	0.00	0.00	68.27	1
AR3.b	3,232,454	51	0.0015	7	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	1
AR4.a	4,052,477	6852	0.0012	10	8.79	0.00	0.15	14.87	65.00	2.12	0.73	1.43	1.17	1.12	12.67	4
AR4.b	2,686,461	44499	0.0019	15	89.45	0.01	0.07	8.96	85.57	2.34	0.60	1.18	0.64	0.34	0.08	4
AR4.c	1,162,022	14705	0.0043	19	65.80	0.01	0.05	6.13	86.55	2.84	1.14	0.85	1.14	0.36	0.10	4
AR5.a	8,877,803	0	0.0006	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
AR5.b	2,591,459	5676	0.0019	13	11.39	0.00	0.18	19.56	71.53	1.15	0.37	2.03	1.80	0.81	0.88	3
AR6.a	4,171,674	3867	0.0012	6	4.08	0.00	2.15	45.18	0.23	5.87	0.36	0.98	0.00	0.00	44.30	2
AR6.b	1,825,578	2174	0.0027	6	6.07	0.00	0.23	39.42	0.37	10.81	3.50	1.24	0.00	0.00	41.35	2
AR6.c	708,172	1071	0.0071	6	5.75	0.00	5.51	76.38	0.00	3.73	0.19	0.28	0.00	0.00	13.63	2
AR7.a	1,012,462	4687	0.0049	12	25.00	0.00	0.45	22.55	72.82	0.47	0.58	1.15	1.66	0.00	0.00	3
AR7.b	11,793,785	82	0.0004	7	0.05	0.00	29.27	0.00	0.00	2.44	0.00	2.44	0.00	0.00	62.20	1
AR7.c	4,122,780	26854	0.0012	12	48.20	0.03	0.15	26.74	69.95	0.38	0.36	0.58	0.88	0.00	0.69	3
AR8.a	1,238,420	19186	0.004	9	102.25	0.01	0.09	23.48	63.91	4.38	0.28	1.25	0.46	0.49	5.39	3
AR9.a	3,977,232	25418	0.0013	5	3.02	0.00	0.34	17.08	1.19	25.66	0.00	5.18	0.34	0.00	45.88	2
AR10.a	5,563,655	1068	0.0009	6	0.61	0.00	0.00	0.00	0.28	7.89	3.00	1.78	0.75	0.00	81.55	1
AR10.b	2,500,367	489	0.002	5	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	5.93	5.32	0.00	0.00	0.00	84.46	1
AR10.c	1,248,058	645	0.004	12	1.09	0.00	0.00	0.00	0.78	24.96	2.48	4.34	0.00	0.00	58.45	1
AR11.a	888,628	34526	0.0056	9	268.09	0.06	0.37	50.73	47.50	0.01	0.06	0.46	0.48	0.11	0.07	3
AR11.b	3,569,423	60	0.0014	4	0.12	25.00	73.33	1.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
AR12.a	3,295,240	31636	0.0015	11	59.52	0.05	0.08	34.77	59.24	1.64	0.91	0.52	0.57	0.09	1.85	3
AR12.b	1,759,564	20147	0.0028	12	57.25	0.00	0.07	16.70	76.95	2.56	0.18	0.37	0.49	0.00	2.27	4
AR13.a	4,824,067	608	0.001	6	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	12.83	6.09	4.44	0.00	0.00	76.64	1
AR14.a	1,195,164	27117	0.0042	9	204.20	0.02	0.13	35.43	60.91	0.62	0.45	0.27	0.00	1.73	0.32	3
AR14.b	650,264	0	0.0077	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
AR15.a	6,738,058	460	0.0007	6	0.50	0.00	0.00	1.30	0.00	5.00	3.91	1.30	0.00	0.00	88.48	1
AR16.a	4,382,993	23318	0.0011	9	44.69	0.00	0.00	4.02	82.02	2.90	1.14	0.75	2.76	3.77	2.11	4
AR16.b	4,798,643	227	0.001	6	0.30	0.00	0.00	2.64	0.00	11.45	2.64	12.33	0.00	0.00	66.52	1
AR17.a	1,848,061	42800	0.0027	23	220.01	0.00	0.01	6.82	80.68	4.92	0.95	1.75	2.43	0.82	1.30	4
AR17.b	6,312,842	69	0.0008	6	0.09	0.00	7.25	0.00	0.00	0.00	0.00	8.70	0.00	0.00	84.06	1

Se presentan las muestras clasificadas por paciente, el tiempo transcurrido en meses desde el inicio del tratamiento con Rituximab, el límite de sensibilidad alcanzado en citometría para detectar un mínimo de 50 LB, el análisis de las subpoblaciones B de cada muestra y la etapa asignada de reconstitución (ver en el texto página 107). Debajo de cada subpoblación se muestran los valores normales para SP, mediana (rango). LB, linfocitos B. Leuco, leucocitos. LB/µL, linfocitos B por microlitro de sangre. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

Tabla 32: (Continuación)

Muestra	N° Leuco. analizados	N° LB analizados	Limite de sensibilidad	Tiempo post-Rx (meses)	LB/μL	Porcentaje de subpoblaciones B										Etapa
						PREC	INM	T	VIRG	MS CD27 ⁺	MS CD27 ⁻	M-NS CD27 ⁺	M-NS CD27 ⁻	ANG	PL	
						0.00 (0.0 - 0.0)	0.02 (0.0 - 0.1)	3.11 (0.5 - 6.0)	50.31 (27.1-71.3)	15.88 (7.9 - 22.9)	1.50 (0.8 - 5.5)	19.44 (9.7 - 40.7)	3.54 (1.2 - 13.5)	0.75 (0.2 - 1.9)	0.52 (0.1 - 2.0)	
AR18.a	7,802,497	5937	0.0006	8	3.04	0.07	2.29	80.11	10.43	1.18	0.66	1.26	0.12	0.00	3.55	2
AR18.b	1,577,126	14	0.0032	5	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	1
AR18.c	1,212,495	25751	0.0041	12	80.70	0.00	0.25	39.10	56.38	1.33	0.31	0.85	0.25	0.05	1.29	3
AR19.a	477,444	0	0.0105	12	137.61	0.00	0.22	30.10	67.35	0.53	0.43	0.21	0.48	0.00	0.58	3
AR20.a	1,290,989	27200	0.0039	12	110.00	0.03	0.07	26.07	61.75	0.39	0.63	0.28	1.93	2.08	6.23	3
AR21.a	951,008	20812	0.0053	23	124.74	0.01	0.05	8.45	82.36	2.72	1.32	1.28	2.37	0.69	0.55	4
AR21.b	4,413,158	117	0.0011	6	0.15	0.85	9.40	0.00	0.00	7.69	0.00	8.55	0.00	0.00	73.50	1
AR22.a	1,185,961	16940	0.0042	11	78.56	0.04	0.24	25.37	67.96	1.28	1.14	0.31	1.25	0.74	1.43	3
AR23.a	839,415	17	0.006	6	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	1
O1.a	6,479,364	5465	0.0008	10	7.34	0.00	0.31	71.18	24.72	1.35	0.37	0.64	0.00	0.00	1.01	2
O1.b	4,353,875	20212	0.0011	17	41.32	0.00	0.07	0.78	90.98	3.61	0.60	1.00	0.62	1.06	0.96	4
O1.c	1,646,965	8166	0.003	20	46.61	0.00	0.07	4.98	86.97	2.33	0.56	0.83	2.18	1.25	0.51	4
O2.a	473,132	0	0.0106	11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
O2.b	16,814,910	1108	0.0003	19	0.56	0.00	0.00	0.00	2.26	44.22	6.05	3.79	2.08	4.06	35.83	1
O2.c	7,649,024	1175	0.0007	21	0.80	0.00	0.00	3.49	1.79	50.13	7.40	3.83	1.53	4.17	25.02	1
O2.d	7,227,056	1262	0.0007	26	1.08	0.00	0.00	3.01	2.61	49.84	6.50	8.40	2.14	2.61	23.30	1
O2.e	2,170,782	794	0.0023	30	1.87	0.00	0.00	3.27	3.15	46.35	3.53	5.04	2.02	4.03	27.71	1
O3.a	4,119,948	1621	0.0012	4	1.93	0.00	3.15	94.08	1.11	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.74	2
O3.b	1,656,402	24307	0.003	6	89.51	0.00	0.21	90.33	9.12	0.02	0.00	0.02	0.19	0.00	0.09	2
O3.c	3,172,522	8166	0.0016	9	69.50	0.00	0.00	45.75	51.89	0.00	0.00	0.61	1.75	0.00	0.00	3
O3.d	4,247,129	14998	0.0012	5	28.60	0.00	0.07	99.71	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	2
O3.e	1,149,192	17359	0.0044	8	105.74	0.00	0.04	31.95	66.67	0.07	0.06	0.38	0.60	0.00	0.17	3
O4.a	2,264,851	36354	0.0022	6	97.91	0.01	0.04	52.84	43.11	0.59	0.49	0.38	1.03	0.64	0.54	3
O4.b	1,066,185	47629	0.0047	12	290.37	0.00	0.01	10.46	82.05	1.17	0.46	1.34	2.00	2.18	0.09	4
O5.a	767,592	28752	0.0065	9	209.76	0.00	0.00	44.07	44.94	2.92	1.26	0.29	0.00	0.00	5.54	3
PV1.a	1,377,815	1298	0.0036	16	6.88	0.00	0.00	28.21	7.69	47.01	5.98	0.85	0.00	0.00	10.26	2
PV1.b	5,195,680	5986	0.001	35	9.56	0.00	0.07	2.52	35.22	21.95	2.57	2.96	3.02	2.09	27.31	4
PV2.a	4,167,381	672	0.0012	14	1.82	0.00	0.00	36.36	10.23	17.05	3.41	2.27	0.00	0.00	29.55	2
PV2.b	2,796,188	3594	0.0018	20	10.54	0.00	0.19	4.79	63.47	8.38	2.25	3.45	2.23	2.98	10.41	4
PV2.c	2,248,089	8326	0.0022	30	31.48	0.00	0.05	9.51	67.39	8.28	1.06	3.95	2.11	3.53	3.00	4
PV3.a	2,483,570	23362	0.002	14	53.62	0.00	0.04	13.74	80.64	1.07	0.28	1.44	0.51	0.06	1.45	4
PV4.a	4,820,548	5728	0.001	12	6.65	0.03	0.16	45.01	46.46	2.57	1.19	1.22	0.37	0.49	1.71	3
PV4.b	2,330,004	12175	0.0021	18	29.26	0.00	0.04	11.04	72.11	3.26	1.95	2.41	4.52	4.19	0.33	4
PV5.a	1,092,829	1467	0.0046	14	13.02	0.00	0.86	46.29	1.43	19.14	4.57	2.00	0.00	0.00	23.14	2
PV5.b	3,127,736	20131	0.0016	22	48.92	0.00	0.00	8.19	80.90	4.22	0.76	1.62	1.50	0.58	1.97	4

Se presentan las muestras clasificadas por paciente, el tiempo transcurrido en meses desde el inicio del tratamiento con Rituximab, el límite de sensibilidad alcanzado en citometría para detectar un mínimo de 50 LB, el análisis de las subpoblaciones B de cada muestra y la etapa asignada de reconstitución (ver en el texto página 107). Debajo de cada subpoblación se muestran los valores normales para SP, mediana (rango). LB, linfocitos B. Leuco, leucocitos. LB/μL, linfocitos B por microlitro de sangre. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

Analizando la distribución de subpoblaciones B en todas las muestras a lo largo del tiempo (Tabla 32), se observa un patrón común de reconstitución B, en el que pueden distinguirse cuatro etapas sucesivas, identificadas simplemente con el análisis de LB transicionales y vírgenes (Tabla 33).

Tabla 33: Etapas post-tratamiento con Rituximab.

	Descripción	Características
ETAPA 1	Depleción (LB < 5 / μ L)	(T < 6%)
ETAPA 2	Inicio de la repoblación: hay una gran proporción de células transicionales, que aún no han comenzado su maduración hacia células vírgenes.	(T > 6%) & (VIRG < 27%)
ETAPA 3	Las células transicionales siguen aumentando en número y maduran progresivamente a LB vírgenes.	(T > 6%) & (T / VIRG) = [0.25 – 2]
ETAPA 4	La mayoría de LB transicionales ha madurado, por lo que su número descende. La subpoblación mayoritaria corresponde a LB vírgenes.	(T / VIRG < 0.25)

T, transicionales rango normal [0.5 – 6.0%]. VIRG, vírgenes rango normal [27 – 73%]

En la **primera etapa** o fase de depleción se reduce drásticamente el número de LB presentes en sangre, llegando incluso a ser indetectables. La principal población detectada son plasmablastos ($M_e = 79.9\%$), debido a su baja expresión de CD20.

El inicio de la reconstitución (**Etapa 2**) está marcado por la aparición de células transicionales ($M_e = 58.74\%$, frente a un 3.11% en controles, $p < 0.0001$), y en menor medida de células inmaduras ($M_e = 0.33\%$, frente a 0.02% en controles, $p = 0.002$). Tras incrementar su número considerablemente, la proporción de células transicionales decrece de manera progresiva al producirse su

maduración a células vírgenes (**Etapa 3**). Su número sigue estando aumentado con respecto a controles ($M_e = 30.06$ cels/ μ L, frente a 6.6 cels/ μ L en controles, $p = 0.0015$). Con respecto a los LB vírgenes, están incrementados tanto en porcentaje como en número con respecto a la etapa anterior (M_e de 61.33% y 49.44 cels/ μ L, frente a 1.23% y 0.06 cels/ μ L, $p < 0.0001$ en ambos casos). En la última etapa (**Etapa 4**), el número de células transicionales disminuye significativamente ($M_e = 2.66$ cels/ μ L, frente a 30.06 en la etapa anterior, $p < 0.0001$), mientras el resto de subpoblaciones continúa aumentando tanto en número como en porcentaje. La Figura 25 muestra un resumen de la cinética de reconstitución B post-Rituximab.

Es importante destacar que a lo largo del periodo de estudio (hasta 30 meses en algunos casos), ningún paciente llegó a recuperar la distribución de linfocitos B propia de controles, manteniéndose un predominio significativo de células vírgenes por encima de límites normales ($M_e = 81.46\%$, frente a 50.31% en controles, $p < 0.0001$).

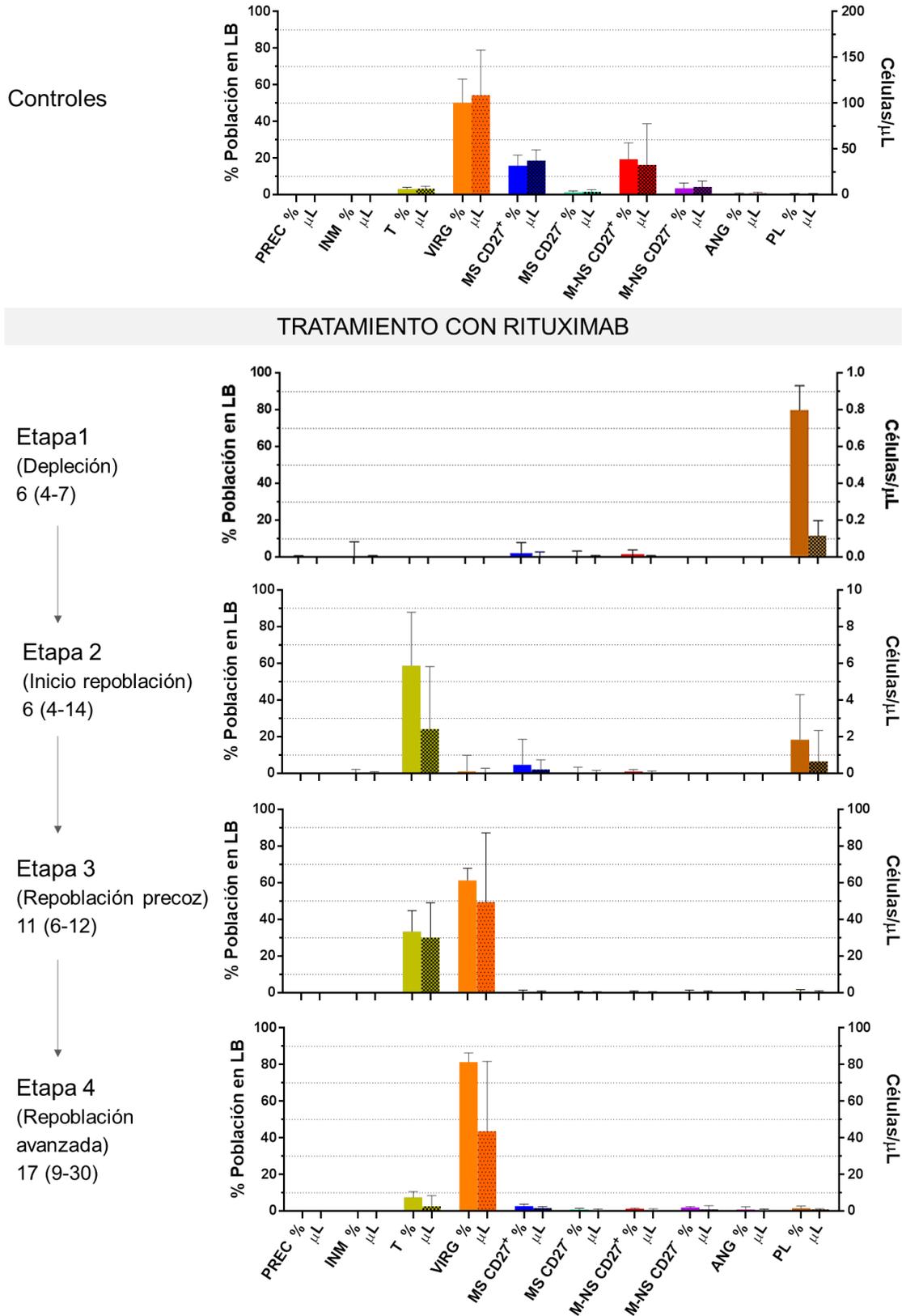


Figura 25: Cinética de reconstitución B post-Rituximab medida en meses, mediana (rango). En cada color la barra oscura representa el nº de células por microlitro de sangre. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas.

La Figura 26 muestra el tiempo y la cantidad de LB para cada una de las etapas de reconstitución B.

- Etapa 1 (n = 16): en torno a los 6 meses post-tratamiento ($M_e = 6$, rango 4 - 7 meses). Todas las muestras presentan < 2 LB/ μ L (M_e de 0.16, rango 0.0 - 1.0 LB/ μ L).
- Etapa 2 (n = 12): aunque la mediana de tiempo post-tratamiento es también de 6 meses, la variabilidad es mayor (4 - 14 meses). La mediana de LB/ μ L es de 5.9 (rango de 1.8 a 89.5 LB/ μ L).
- Etapa 3 (n = 16): como la reconstitución avanza con el tiempo, aproximadamente un año tras el tratamiento se detecta presencia significativa de LB vírgenes ($M_e = 11$, rango de 6 - 12 meses). El n° de LB aumenta ($M_e = 89.3$ LB/ μ L), con gran variabilidad entre pacientes (rango de 6.7 - 268.1 LB/ μ L).
- Etapa 4 (n = 18): la última etapa de la repoblación se alcanza en torno a los 17 meses ($M_e = 17$, rango 9 - 30 meses). Es importante destacar que el n° de LB se encuentra por debajo de límites normales en 15 de 18 muestras ($M_e = 54.8$ LB/ μ L, rango 8.8 - 290.4)

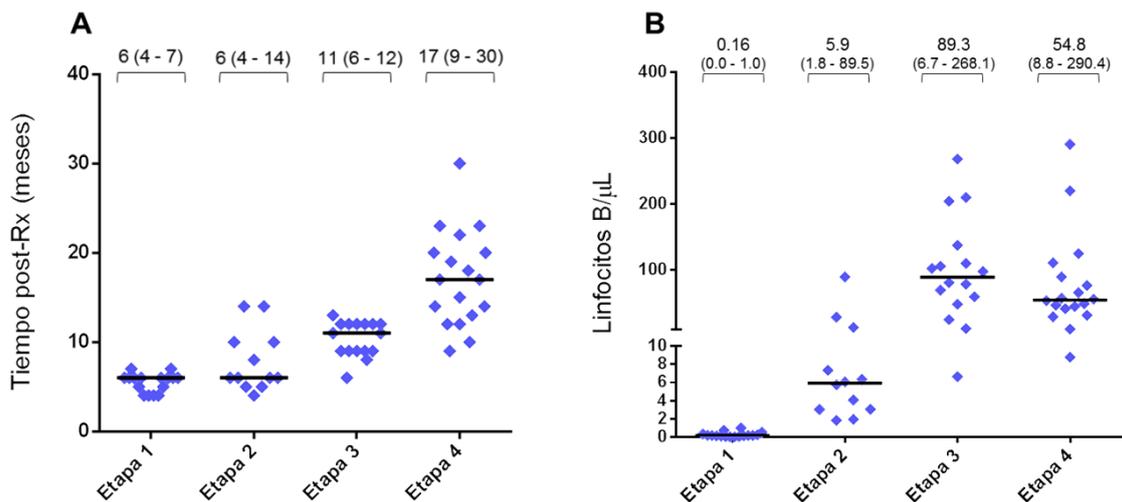


Figura 26: Tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento con Rituximab (A) y cantidad de linfocitos B totales en sangre periférica (B) en todas las muestras analizadas, clasificadas en función de la etapa de reconstitución B. Se muestran la mediana y (rango).

2. SUBPOBLACIONES B PERSISTENTES TRAS EL TRATAMIENTO CON RITUXIMAB

Analizamos las muestras en fase de depleción en busca de subpoblaciones B persistentes a la acción del Rituximab (Tabla 35). La población mayoritaria fue lógicamente la de plasmablastos, debido a su incompleta expresión de CD20 ($M_e = 70.89$, rango 0 - 100). El resto de subpoblaciones persistentes correspondió fundamentalmente a LB memoria: MS CD27⁺, $M_e = 5.57\%$, 0.0245 LB/ μ L; MS CD27⁻, $M_e = 1.24\%$, 0.0040 LB/ μ L; M-NS CD27⁺, $M_e = 1.30\%$, 0.0055 LB/ μ L.

En la Figura 27 se muestra la relación existente entre las dos principales poblaciones persistentes tras el Rx.

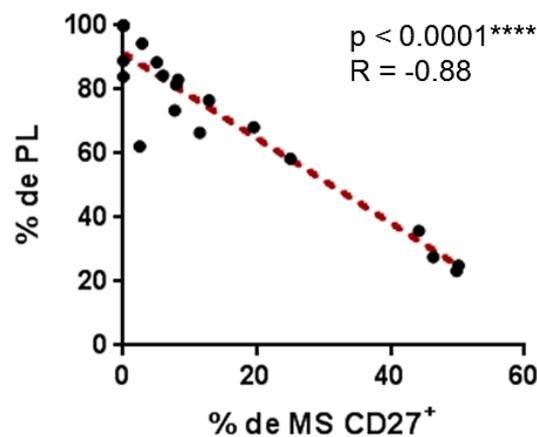


Figura 27: Correlación entre porcentaje de PL y M-NS CD27⁺ en la etapa 1 de depleción B. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

Es importante destacar que durante la fase de depleción o etapa 1, la frecuencia de células MS CD27⁺ es superior a la de células M-NS CD27⁺, a diferencia de lo que ocurre en condiciones normales (Figura 28).

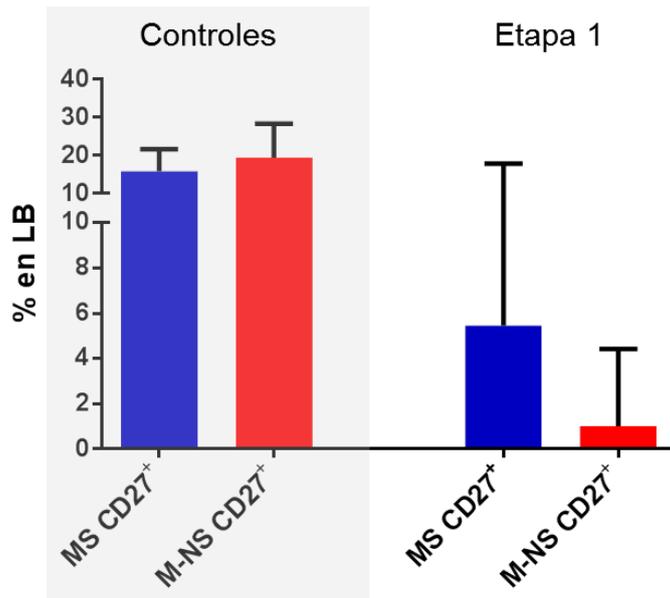


Figura 28: Mediana y rango del porcentaje de células MS CD27⁺ y M-NS CD27⁺ en controles (izquierda) y en la fase de depleción de pacientes tratados con Rituximab.

También estudiamos el tamaño del *cluster* o número de eventos adquiridos de LB para cada una de las muestras en depleción. Asimismo, calculamos el tamaño del *cluster* para una adquisición teórica de 2, 3 y 5 millones de leucocitos. Para una adquisición teórica de 2 millones de leucocitos, 14 de las 24 muestras quedan por encima del límite de sensibilidad establecido (*cluster* de 50 eventos), mientras que para 3 y 5 millones son 17 y 19 muestras respectivamente (Tabla 34).

Tabla 34: Número de eventos adquiridos y tamaño del *cluster* de LB para cada una de las muestras en depleción

Muestra	N° Leucocitos	LB (%)	LB/ μ L	Tamaño de <i>cluster</i>			
				Analizado	para 2 millones de leucocitos	para 3 millones de leucocitos	para 5 millones de leucocitos
AR2.a	9,505,540	0.0128	0.73	1222	257	386	643
AR2.b	6,845,792	0.0029	0.22	200	58	88	146
AR2.c	4,947,181	0.0157	0.99	776	314	471	784
AR3.a	16,802,217	0.0023	0.17	394	47	70	117
AR3.b	3,232,454	0.0016	0.16	51	32	47	79
AR5.a	8,877,803	0.0000	0.00	0	0	0	0
AR7.b	11,793,785	0.0007	0.05	82	14	21	35
AR10.a	5,563,655	0.0192	0.61	1068	384	576	960
AR10.b	2,500,367	0.0195	0.55	489	391	587	978
AR10.c	1,248,058	0.0517	1.09	645	1034	1550	2584
AR11.b	3,569,423	0.0017	0.12	60	34	50	84
AR13.a	4,824,067	0.0126	0.16	608	252	378	630
AR14.b	650,264	0.0000	0.00	0	0	0	0
AR15.a	6,738,058	0.0068	0.50	460	137	205	341
AR16.b	4,798,643	0.0047	0.30	227	95	142	237
AR17.b	6,312,842	0.0011	0.09	69	22	33	55
AR18.a	1,577,126	0.0009	0.04	14	18	27	44
AR21.b	4,413,158	0.0026	0.15	117	53	80	133
AR23.a	839,415	0.0020	0.11	17	41	61	101
O2.a	473,132	0.0000	0.00	0	0	0	0
O2.b	16,814,910	0.0066	0.56	1108	132	198	329
O2.c	7,649,024	0.0154	0.80	1175	307	461	768
O2.d	7,227,056	0.0175	1.08	1262	349	524	873
O2.e	2,170,782	0.0366	1.87	794	732	1097	1829

Número de leucocitos adquiridos, porcentaje de linfocitos B y n° de linfocitos B por microlitro en el conjunto de muestras analizadas en fase de depleción. A la derecha se muestra el tamaño de *cluster* (de LB) analizado en cada caso y el *cluster* teórico calculado para una adquisición de 2, 3 y 5 millones de leucocitos. Se marcan en gris las muestras que quedan por debajo del límite de sensibilidad establecido en 50 eventos.

En el grupo de pacientes con Artritis Reumatoide se estudió la correlación existente entre cada una de estas subpoblaciones y el valor de DAS28 (mostrado en Material y Métodos, página 53), encontrándose correlaciones significativas para el porcentaje y nº de LB/ μ L de las subpoblaciones MS-CD27⁺ (R = 0.684 y 0.76, respectivamente) y MS CD27⁻ (R = 0.765 y 0.785, respectivamente), y para el nº de LB/ μ L de plasmablastos (R = 0.778) (Figura 29). Agrupando subpoblaciones, se observa que el porcentaje de LB CD27⁺ (incluyendo con y sin cambio de isotipo) no presenta correlación significativa con DAS28, a diferencia del de LB con cambio de isotipo (incluyendo CD27⁺ y CD27⁻) (R = 0.725). El nº de LB/ μ L de ambas poblaciones (LB CD27⁺ por un lado, y LB con cambio de isotipo por otro) correlaciona significativamente con DAS28 (R = 0.665 y 0.806, respectivamente).

No se encontró ninguna correlación significativa con DAS28 para ninguna subpoblación B en las etapas 2, 3 y 4.

Tabla 35A: Distribución de subpoblaciones B en muestras en fase de depleción (porcentaje)

Muestra	Porcentaje de subpoblaciones B (Etapa 1)									
	PREC	INM	T	VIRG	MS CD27 ⁺	MS CD27 ⁻	M-NS CD27 ⁺	M-NS CD27 ⁻	ANG	PL
AR2.a	0.90	3.68	0.00	0.00	8.18	3.36	0.74	0.00	0.00	83.14
AR2.b	2.50	8.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	89.00
AR2.c	0.39	1.03	0.00	0.00	2.84	0.00	1.29	0.00	0.00	94.46
AR3.a	0.00	0.00	0.00	0.00	19.54	12.18	0.00	0.00	0.00	68.27
AR3.b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
AR5.a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
AR7.b	0.00	29.27	0.00	0.00	2.44	0.00	2.44	0.00	0.00	62.20
AR10.a	0.00	0.00	0.00	0.28	7.89	3.00	1.78	0.75	0.00	81.55
AR10.b	0.00	0.00	0.00	0.00	5.93	5.32	0.00	0.00	0.00	84.46
AR10.c	0.00	0.00	0.00	0.78	24.96	2.48	4.34	0.00	0.00	58.45
AR11.b	25.00	73.33	1.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
AR13.a	0.00	0.00	0.00	0.00	12.83	6.09	4.44	0.00	0.00	76.64
AR14.b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
AR15.a	0.00	0.00	1.30	0.00	5.00	3.91	1.30	0.00	0.00	88.48
AR16.b	0.00	0.00	2.64	0.00	11.45	2.64	12.33	0.00	0.00	66.52
AR17.b	0.00	7.25	0.00	0.00	0.00	0.00	8.70	0.00	0.00	84.06
AR18.a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
AR21.b	0.85	9.40	0.00	0.00	7.69	0.00	8.55	0.00	0.00	73.50
AR23.a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
O2.a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
O2.b	0.00	0.00	0.00	2.26	44.22	6.05	3.79	2.08	4.06	35.83
O2.c	0.00	0.00	3.49	1.79	50.13	7.40	3.83	1.53	4.17	25.02
O2.d	0.00	0.00	3.01	2.61	49.84	6.50	8.40	2.14	2.61	23.30
O2.e	0.00	0.00	3.27	3.15	46.35	3.53	5.04	2.02	4.03	27.71
Mediana	0	0	0	0	5,47	1,24	1,30	0	0	70,89
(rango)	(0-25)	(0-73)	(0-3.5)	(0-3.1)	(0-50.1)	(0-1.2)	(0-12.3)	(0-2.1)	(0-4.1)	(0-100)

PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

Tabla 35B: Distribución de subpoblaciones B en muestras en fase de depleción (nº LB/µL)

Muestra	Células por microlitro (Etapa 1)									
	PREC	INM	T	VIRG	MS CD27 ⁺	MS CD27 ⁻	M-NS CD27 ⁺	M-NS CD27 ⁻	ANG	PL
AR2.a	0.007	0.027	0.000	0.000	0.060	0.025	0.005	0.000	0.000	0.609
AR2.b	0.005	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.192
AR2.c	0.004	0.010	0.000	0.000	0.028	0.000	0.013	0.000	0.000	0.933
AR3.a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.021	0.000	0.000	0.000	0.117
AR3.b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.163
AR5.a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AR7.b	0.000	0.013	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.028
AR10.a	0.000	0.000	0.000	0.002	0.048	0.018	0.011	0.005	0.000	0.501
AR10.b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.029	0.000	0.000	0.000	0.462
AR10.c	0.000	0.000	0.000	0.008	0.271	0.027	0.047	0.000	0.000	0.634
AR11.b	0.029	0.085	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AR13.a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.010	0.007	0.000	0.000	0.126
AR14.b	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AR15.a	0.000	0.000	0.006	0.000	0.030	0.030	0.006	0.000	0.000	0.440
AR16.b	0.000	0.000	0.008	0.000	0.035	0.008	0.037	0.000	0.000	0.201
AR17.b	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.080
AR18.a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.039
AR21.b	0.001	0.014	0.000	0.000	0.012	0.000	0.013	0.000	0.000	0.111
AR23.a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.109
O2.a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
O2.b	0.000	0.000	0.000	0.013	0.248	0.034	0.021	0.012	0.023	0.201
O2.c	0.000	0.000	0.028	0.014	0.400	0.059	0.031	0.053	0.033	0.200
O2.d	0.000	0.000	0.033	0.028	0.540	0.070	0.091	0.023	0.028	0.252
O2.e	0.000	0.000	0.061	0.059	0.865	0.066	0.094	0.038	0.075	0.517
Mediana	0	0	0	0	0.0245	0.0040	0.0055	0	0	0.1775
(rango)	(0-0.03)	(0-0.08)	(0-0.06)	(0-0.06)	(0-0.87)	(0-0.07)	(0-0.10)	(0-0.05)	(0-0.07)	(0-0.93)

PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

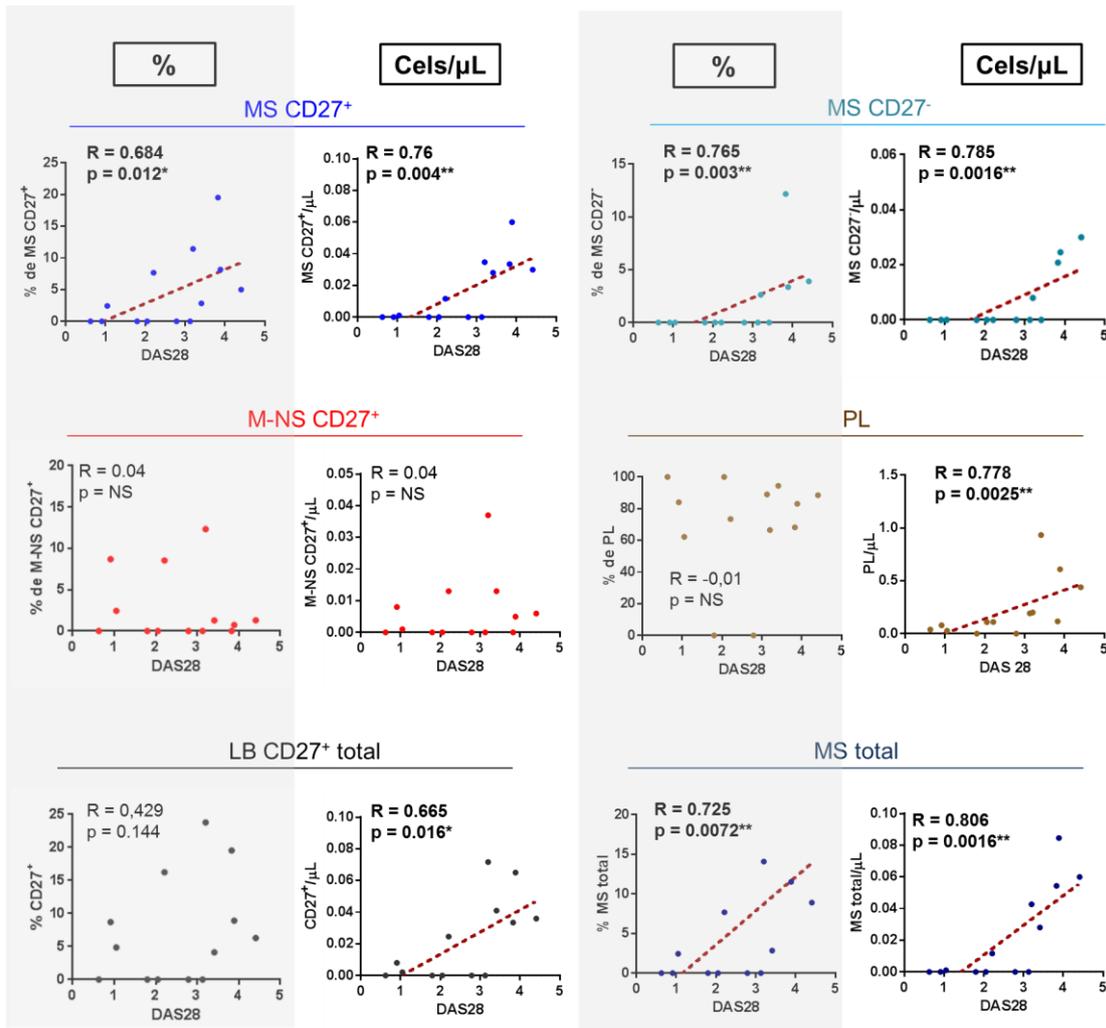


Figura 29: Correlaciones significativas observadas entre porcentaje y n° de LB/μL de subpoblaciones B y el valor de DAS28 en muestras analizadas de pacientes con Artritis Reumatoide, en la etapa de depleción B. Las muestras incluidas en el análisis son AR2.a, AR2.b, AR2.c, AR3.a, AR7.b, AR11.b, AR14.b, AR15.a, AR16.b, AR17.b, AR18.a, AR21.b y AR23.a. No se encontraron correlaciones significativas para el resto de subpoblaciones B en la etapa 1, ni para ninguna subpoblación en las etapas 2, 3 y 4.

MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. PL, células plasmáticas y plasmablastos. LB CD27⁺ total, conjunto de linfocitos de memoria CD27⁺, se incluyen MS y M-NS. MS total, conjunto de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo tanto CD27⁺ como CD27⁻.

Discusión

1. ASPECTOS TÉCNICOS RELATIVOS AL ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES B

1.1. Desarrollo de un protocolo simplificado de citometría de alta sensibilidad.

Tal como se explicó en la Introducción, la citometría de alta sensibilidad requiere la adquisición de un elevado número de leucocitos. Esto plantea dos dificultades que suponen una limitación a la hora de implementar esta técnica en la práctica cotidiana: en primer lugar, el tiempo de adquisición de la muestra aumenta en función del nº de leucocitos analizados; en segundo lugar, el coste se multiplica por el nº de marcajes individuales realizados para cada combinación de marcadores. Por este motivo, hemos desarrollado un protocolo simplificado de citometría de alta sensibilidad, que permita superar estas limitaciones en la medida de lo posible.

Para reducir el tiempo de adquisición nos planteamos aumentar la tasa de flujo por encima de valores habituales, que se sitúan en torno a 4000-5000 evt/seg, (Ashcroft y Lopez 2000; Domingo et al. 2010). Es bien sabido que a medida que aumenta la tasa de adquisición de muestras, se produce un incremento en el número de abortos electrónicos, lo cual puede comprometer los resultados obtenidos (Ibrahim y Van Den Engh 2003). En este sentido, hemos encontrado una correlación significativa entre ambos parámetros con una R de 0.98 (Figura 5), observando 9% de abortos electrónicos para una tasa de flujo en torno a 11,500 evt/seg. Para comprobar si este incremento en la tasa de abortos afectaba a los resultados, comparamos los porcentajes obtenidos para células CD34⁺, linfocitos B, células plasmáticas y linfocitos T CD4⁺ en muestras de SP y MO utilizando 3 tasas de flujo diferentes: flujo bajo (mediana, 3,375 ev/seg), flujo medio (mediana, 5,508 ev/seg) y flujo alto (mediana, 11,577 ev/seg). En ningún caso observamos diferencias significativas para ninguno de los porcentajes analizados, por lo que podemos afirmar que *en un citómetro FACSCanto II la tasa de flujo de adquisición de muestras se puede aumentar al menos hasta 12,000 eventos por segundo sin que se afecte la calidad de los resultados obtenidos*. Esto reduce significativamente el tiempo de adquisición de muestras, lo que resulta especialmente valioso para estudios de citometría de alta sensibilidad.

Con respecto al incremento de coste que supone aumentar la sensibilidad de la técnica, nos planteamos aumentar la concentración de marcaje por encima del estándar de 20 mill cels/mL (Cheminant et al. 2015; Domingo et al. 2010; Paiva et al. 2011; Sarasquete et al. 2005), con el objetivo de reducir el nº de tubos de marcaje individual. Comparamos el análisis de muestras de MO marcadas a 20, 40 y 80 mill cels/mL, manteniendo constante la tasa de adquisición y el nº de leucocitos adquiridos.

Los resultados muestran que un aumento de la concentración de marcaje a 40 mill cels/mL afecta a la exactitud de los porcentajes celulares analizados, observándose un incremento en torno al 10% en el porcentaje de células CD34⁺, LB y células plasmáticas. Para la concentración de 80 mill cels/mL el incremento estuvo en torno al 20% (Tabla 20 y Tabla 21, página 63).

Este incremento de porcentajes reflejaba un aumento en el nº de eventos detectados para cada una de las 3 subpoblaciones analizadas, puesto que el nº total de leucocitos adquiridos se mantuvo constante (Tabla 22, página 66). Hay que suponer por tanto que se produjo un descenso en el número de eventos de poblaciones no analizadas. Cabe plantearse que a concentraciones elevadas de marcaje se produzcan fenómenos de agregación celular que afecten selectivamente a poblaciones específicas, como granulocitos CD16⁺. Tales agregados serían eliminados por el citómetro en forma de abortos electrónicos, lo que modificaría la composición de la población leucocitaria total, sobreestimándose los porcentajes de las poblaciones que no sufren agregación.

Puesto que 40 mill cel/mL demostró ser una concentración excesiva, reprodujimos los estudios realizados a las concentraciones de 20 y 30 mill cel/mL. Los resultados obtenidos fueron similares en ambos casos (Tabla 24, página 68), lo que permite concluir que *la concentración celular de marcaje se puede aumentar hasta un máximo de 30 millones de células/mL sin que se afecte la precisión y exactitud de los resultados obtenidos*. Este incremento de concentración celular de 20 a 30 mill cel/mL supone una reducción de un tercio en el coste de la técnica.

Recientemente, el consorcio Euroflow ha propuesto un método que permite marcar conjuntamente cantidades muy elevadas de células (en torno a 10 millones), por lo que el incremento de coste se atenúa. Se trata del método “Bulk lysis”, que parte de cantidades elevadas de muestra, sobre la que, previamente al marcaje, se realiza lisis de hematíes con solución de cloruro de amonio (Kalina et al. 2012). Sin embargo, faltan estudios que analicen si este método implica la pérdida selectiva de alguna población celular (O’Donahue y Johnson 2016).

1.2. Desarrollo de un sistema que evalúa el grado de hemodilución de una muestra de médula ósea.

Un factor limitante a la hora de realizar estudios de alta sensibilidad en MO es la inevitable presencia de SP contaminante, ya que este tipo de muestra procede siempre de la segunda aspiración de médula, habiéndose destinado los copos iniciales para estudio morfológico (Bain 2001; Smock, Perkins, y Bahler 2007). Si la cantidad de SP contaminante sobrepasa un cierto límite, la muestra no puede considerarse representativa de MO y debe ser desechada. La Tabla 29 muestra el estudio de subpoblaciones B de dos muestras de MO excesivamente hemodiluidas. Se observa cómo sus valores para subpoblaciones cuya presencia es significativamente distinta en SP y MO (células precursoras B, linfocitos B inmaduros, células plasmáticas y las subpoblaciones memoria MS CD27⁺, M-NS CD27⁺, M-NS CD27⁻) son lógicamente más cercanos a SP que a MO. Este efecto es especialmente importante cuando el objetivo del análisis es la identificación de poblaciones minoritarias, como determinadas subpoblaciones B o Enfermedad Mínima Residual (EMR) (Agrawal et al. 2013; Brooimans et al. 2009; Gupta et al. 2009; Rawstron et al. 2008; Westers et al. 2012).

Los métodos más utilizados actualmente para evaluar la calidad de las muestras de MO son el análisis morfológico (Brando et al. 2000; Johansson et al. 2014) y la identificación de progenitores B, mieloides o eritroides por citometría (Loken et al. 2008; Rawstron et al. 2008). Ambos métodos son cualitativos, pero su mayor limitación radica en que detectan mayoritariamente

presencias muy elevadas de SP contaminante. Hay descritos métodos cuantitativos, pero requieren la utilización de muestras pareadas de SP y MO del mismo paciente, lo que limita significativamente su implementación en la práctica diaria (Aldawood et al. 2015; Holdrinet et al. 1980).

Nos propusimos desarrollar un método cuantitativo sencillo, basado en el uso de marcadores de análisis habitual en un laboratorio de citometría, que no requiere disponer de una muestra pareada de SP. Con los porcentajes obtenidos para células CD34⁺ y células plasmáticas con respecto al total de leucocitos de MO, y el porcentaje de células CD10⁺ con respecto a la población de granulocitos, se obtiene un índice que hemos denominado ICSP (Índice de contaminación con SP), cuyo valor debe ser inferior a 1.2 para que la muestra pueda considerarse representativa de MO. De las 95 muestras de buena calidad analizadas, sólo una mostró un valor de ICSP > 1.2 (1.55). Todas las muestras hemodiluidas (n = 27) tuvieron valores de ICSP > 1.2 (Figura 12). La aplicabilidad del método se comprobó en muestras de MO infiltradas por neoplasias hematológicas, observándose una sola muestra con un valor de ICSP ligeramente por debajo de lo esperado (Figura 15). Por tanto, *el análisis combinado de los porcentajes de células CD34⁺, células plasmáticas y neutrófilos en muestras de médula ósea permite evaluar su grado de hemodilución con una sensibilidad y especificidad superior al 95 %.*

El cálculo del valor de ICSP en las muestras de MO recibidas diariamente en un laboratorio de citometría diagnóstica ofrece la ventaja de la sencillez, unida al hecho de que utiliza marcadores que muy probablemente forman parte del propio estudio diagnóstico de la muestra. Pero sobre todo, permite evaluar el grado de hemodilución de las muestras de calidad subóptima, en función de la posición que ocupa su valor de ICSP en una escala que se inicia en el punto de corte (1.2) y termina en el valor del índice para SP (3.45). De este modo, permite evaluar el grado de infraestimación del resultado obtenido, para decidir sobre la necesidad de obtención de nueva muestra, por ejemplo en estudios de EMR.

El cálculo del ICSP en la práctica diaria también supone una ayuda para analizar discrepancias entre técnicas, como la ampliamente descrita entre el

porcentaje de células plasmáticas obtenido por análisis morfológico o citométrico (Gupta et al. 2009; Rawstron et al. 2008; Smock, Perkins, y Bahler 2007). La Figura 11 muestra cómo esta discrepancia concreta está estrechamente relacionada con el grado de hemodilución de las muestras.

Hay que destacar que las patologías que alteran los porcentajes de dos de las tres poblaciones utilizadas para el cálculo del índice constituyen una limitación del método. Es el caso del SMD, que aumenta el porcentaje de células CD34⁺ en MO, disminuyendo el de neutrófilos, lo que produce un descenso artificial del valor de ICSP, que pierde por tanto su función. Aquellas patologías que afectan únicamente a una de las tres poblaciones (por ejemplo, MM o MGUS) se sitúan dentro de la aplicabilidad del método (Figura 14).

1.3. Panel de marcadores para el análisis de linfocitos B

La combinación formada por CD19, CD38, CD27, CD24, IgM e IgD CD19 constituye los denominados marcadores *backbone* más utilizados para estudio de linfocitos B (Tabla 2, página 24), ya que permiten identificar las principales subpoblaciones B a lo largo de todo el proceso de diferenciación. Éste se inicia con las **células precursoras B** (CD38⁺⁺⁺, CD24⁺⁺⁺, CD27^{+/-}, IgM⁻, IgD⁻) y **linfocitos B inmaduros** (CD38⁺⁺⁺, CD24⁺⁺⁺, CD27⁻, IgM^{+/-het}, IgD⁻). Aunque la localización preferente de ambas poblaciones es lógicamente MO ($M_e = 30.60\%$ y 4.73% , respectivamente) (Figura 19, página 93), hay que destacar que ambas fueron también detectadas en muestras de amígdala ($M_e = 0.03\%$ y 0.01% , respectivamente) (Tabla 28 y Figura 20, página 95), en consonancia con datos de la bibliografía (Lopez-Gonzalez et al. 1998; Meru et al. 2002; M. Pascual et al. 2015; Strauchen y Miller 2003). El siguiente estadio, considerado intermedio entre los LB inmaduros de MO y los vírgenes maduros de SP, corresponde a **LB transicionales** (CD38⁺⁺, CD24⁺⁺, CD27⁻, IgM⁺⁺, IgD⁺), presentes mayoritariamente en MO ($M_e = 4.65\%$) pero también en SP ($M_e = 3.11\%$). Los **LB vírgenes** (CD38⁺, CD24⁺, CD27⁻, IgM⁺, IgD⁺), que constituyen la subpoblación B mayoritaria en SP ($M_e = 50.31\%$), circulan entre los diferentes órganos linfoides siendo detectables en todos ellos. Los **LB de centro germinal** (CD38⁺⁺, CD24⁻, CD27^{+/-het}, IgM^{+/-het}, IgD^{-/+}), propios de zonas

con alta exposición antigénica (Zou y Diamond 2013), fueron detectados en amígdala ($M_e = 41.64\%$), y muy minoritariamente en ganglio linfático ($M_e = 0.13\%$).

Con respecto a la población B memoria, se identifican 4 subpoblaciones en función de la expresión de CD27 y el cambio de isotipo de inmunoglobulinas: **LB memoria CD27⁺ con cambio de isotipo** (CD38^{+/-}, CD24⁺⁺, CD27⁺, IgM⁻, IgD⁻), residentes principalmente en órganos linfoides secundarios (Lanzavecchia y Sallusto 2009; Perez-Andres et al. 2010; Sanz et al. 2008) fueron detectados principalmente en ganglio ($M_e = 50.38\%$) y bazo ($M_e = 32.18\%$); **LB memoria CD27⁻ con cambio de isotipo** (CD38^{+/-}, CD24⁺, CD27⁻, IgM⁻, IgD⁻), subpoblación minoritaria cuyo origen no está del todo aclarado, pudiendo corresponder a células memoria exhaustas que reducen la expresión de CD27, a células memoria tempranas que aún no han adquirido CD27 o bien a células con identidad propia que responden a estímulos específicos (Perez-Andres et al. 2010; Wu, Kipling, y Dunn-Walters 2011); **LB memoria CD27⁺ sin cambio de isotipo** (CD38^{+/-}, CD24⁺⁺⁺, CD27⁺, IgM⁺⁺⁺, IgD⁺), a los que se relaciona con la zona marginal del tejido linfoide (Steiniger et al. 1997, 2005; Wardemann y Nussenzweig 2007; Weill, Weller, y Reynaud 2009), y finalmente, los minoritarios **LB memoria CD27⁻ sin cambio de isotipo** (CD38⁻, CD24⁺⁺, CD27⁻, IgM⁺⁺, IgD⁺), cuyo origen y función son desconocidos (Colombo et al. 2013; Weston-Bell et al. 2009).

El estadio final de diferenciación corresponde a **plasmablastos y células plasmáticas** (PL), (CD38⁺⁺⁺, CD24⁻, CD27⁺⁺⁺, IgM^{+/+}, IgD^{+/+}), detectados fundamentalmente en MO ($M_e = 1.43\%$) y amígdala ($M_e = 2.50\%$) (Bemark et al. 2012; Perez-Andres et al. 2010).

Además de las diez subpoblaciones anteriores, tradicionalmente descritas en estudios del compartimento B, este panel identifica células que no pertenecen a ninguna de ellas, cuyo fenotipo es el siguiente: CD38^{+/+}, CD24⁻, CD27^{+/+}, IgM^{+/+}, IgD^{+/+}. Tal como se muestra en la Figura 16f se caracterizan por su ausencia de expresión de CD21, correspondiendo por tanto a la undécima población identificada, denominada linfocitos B “anérgicos” (ver página 83).

Existen dos poblaciones adicionales de presencia absolutamente residual que también son identificables con este panel: LB memoria “IgD Only”, denominados así por expresar únicamente este isotipo en su membrana. Son CD38^{+/−}, CD24⁺⁺, CD27⁺, IgM[−], IgD⁺⁺ y están descritos principalmente en mucosa del tracto respiratorio. Se les ha implicado en respuestas proinflamatorias y parecen incluir un alto porcentaje de células autorreactivas (Koelsch et al. 2007; Seifert et al. 2009). Las hemos detectado en muestras de amígdala ($M_e = 0.5\%$), teniendo una representación todavía menor en el resto de tejidos analizados ($M_e < 0.3\%$) (datos no mostrados).

Análogamente hay autores que postulan la existencia de LB memoria “IgM Only” (CD38^{+/−}, CD24⁺⁺, CD27⁺, IgM⁺⁺, IgD[−]) (Lanzavecchia y Sallusto 2009). Su existencia como subpoblación diferenciada es controvertida, ya que algunos autores consideran que se trata de células pertenecientes a la población M-NS CD27⁺ que presentan una muy baja expresión de IgD (Colombo et al. 2013; Klein, Rajewsky, y Kuppers 1998; Steiniger et al. 2005; Tangye y Good 2007; Weill, Weller, y Reynaud 2009).

En resumen, el panel compuesto por los seis marcadores que hemos considerado estructurales distingue claramente once subpoblaciones principales en el compartimento B (Figura 30), y es aplicable a muestras de SP, MO, y distintos tipos de tejido linfoide. El tejido que presenta mayor número de subpoblaciones distintas es la amígdala, en que se detectan todas, seguida por MO, en que sólo falta el centro germinal (Figura 19). Es importante destacar que *el análisis de distribución de subpoblaciones linfocitarias B en médula ósea requiere la comprobación previa de que el grado de hemodilución de la muestra se mantiene dentro de límites aceptables*. Encontramos correlaciones significativas entre el grado de hemodilución de las muestras de MO, evaluado con el índice ICSP, y los porcentajes obtenidos para las subpoblaciones cuya presencia es significativamente diferente en SP y MO (PREC, INM, MS CD27⁺, M-NS CD27⁺, M-NS CD27[−] y PL) (Figura 21). Análogamente, las muestras de valor ICSP elevado mostraron una distribución de poblaciones impropia de MO (Tabla 29).

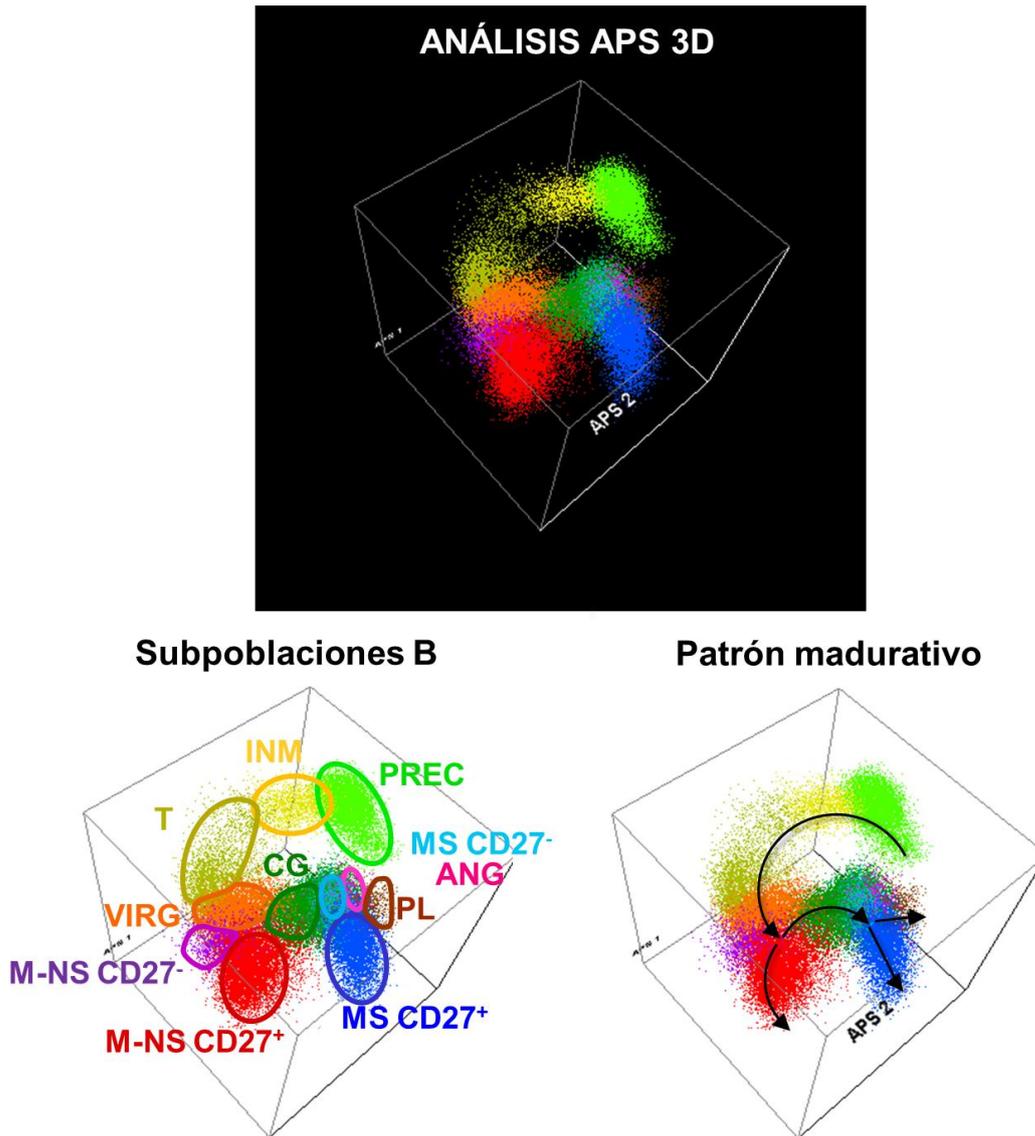


Figura 30: Subpoblaciones de linfocitos B identificadas mediante la combinación de marcadores CD19, CD38, CD24, CD27, IgM e IgD. Se muestran diagramas APS (*Automatic Population Separator*) elaborados con el software Infinicyt. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas y plasmablastos.

Con respecto al resto de marcadores analizados, el análisis de las moléculas CD23, CD1c, JAM-C y B220 no suponen ningún valor añadido al panel estructural, tal como se explicó en Resultados y se resume en la Tabla 36. Un caso distinto es el relativo a las moléculas CD21 y CD10.

Tabla 36: Patrón de expresión de las moléculas CD21, CD10, CD1c, CD23, JAMC y B220 en las once subpoblaciones B identificadas con los marcadores backbone.

	CD21	CD10	CD1c	CD23	JAMC	B220
PREC	-	++	-	-	-	-/+
INM	-	+	-	-	-	+/-
T	+/-	+/-	+/-	+/-	-/+	+
VIRG	+	-	-/+	+	+/-	+
CG	+	+	-	-	-	+
MS CD27⁺	+	-	-/+	-/+	+/-	-/+
MS CD27⁻	+	-	-/+	-/+	+/-	+/-
M-NS CD27⁺	+	-	+	-/+	+	-/+
M-NS CD27⁻	+	-	+/-	-/+	+	+/-
ANG	-	-	-/+	-/+	+/-	+/-
PL	-/+	-	-/+	-/+	-/+	-/+

Het, heterogéneo. (+), marcador positivo. (-), marcador negativo. (+/-) marcador principalmente positivo aunque presenta células negativas. (-/+), marcador principalmente negativo aunque presenta células positivas. PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. CG, centro germinal. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻ células en la región de memoria B sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas.

El patrón observado para CD21 coincide con el descrito en la literatura (Marie-Cardine et al. 2008; Palanichamy et al. 2009; Suryani et al. 2010). Su expresión es inicialmente negativa (tanto en células precursoras como inmaduras), aumenta gradualmente en células transicionales hasta hacerse completamente positivo en células vírgenes. Esta positividad se mantiene constante durante el resto del desarrollo B a excepción del estadio final de plasmáticas y plasmablastos (Tabla 36). Existe una subpoblación de linfocitos B maduros caracterizada por su baja o ausente expresión de CD21, a la que se ha denominado “*anérgica*” por su alta expresión de receptores inhibidores, baja respuesta frente a antígenos y gran susceptibilidad a sufrir procesos apoptóticos. A pesar de este estado funcional que se define como anérgico, son LB capaces de responder a determinados estímulos, manteniendo la

capacidad de diferenciación hacia células plasmáticas (Thorarinsdottir et al. 2015, 2016). Estudios recientes postulan que se trataría de una subpoblación muy heterogénea, incluyendo células B memoria de distinta procedencia (Thorarinsdottir et al. 2016). Se han identificado tanto en muestras de amígdala (Ehrhardt et al. 2005) como de sangre, donde su número está aumentado en condiciones de estimulación inmunológica crónica, como infecciones (Charles et al. 2011), enfermedades autoinmunes como AR, LES y Síndrome de Sjögren (Isnardi et al. 2010; Saadoun et al. 2013; Wehr et al. 2004) e inmunodeficiencias como la ICV (Thorarinsdottir et al. 2015; Warnatz et al. 2002). Por este motivo, la inclusión de CD21 en paneles de análisis de subpoblaciones B se está extendiendo para estudios en pacientes con enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias (Adlowitz et al. 2015; Boldt et al. 2014; Kverneland et al. 2016; Yazdani et al. 2017). De hecho, propuestas de estandarización para la monitorización inmunitaria en ensayos clínicos, como la realizada por el consorcio científico ONE Study, incluyen CD21 en sus recomendaciones, con el objetivo de identificar esta población CD21^{low} (Streitz et al. 2013).

Tal como hemos descrito anteriormente, esta población de LB anérgicos presenta un fenotipo característico con el panel estructural utilizado (CD38^{+/+}, CD24⁻, CD27^{+/+}, IgM^{+/+}, IgD^{+/+}) (Figura 16f). Sin embargo, comprobamos en varias muestras la dificultad para identificar correctamente esta población en ausencia del marcador CD21 (Figura 31).

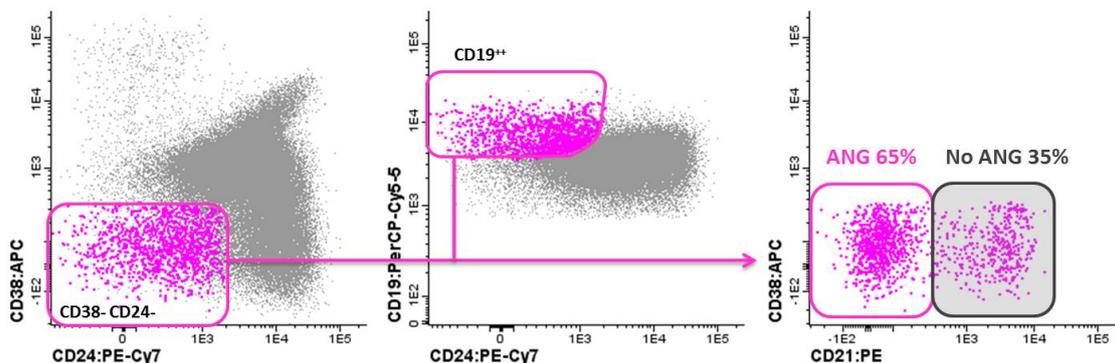


Figura 31: Selección de población ANG con los marcadores “backbone” CD38, CD24 y CD19 en el total de linfocitos B. El análisis de CD21 demuestra que la población seleccionada, cuyo fenotipo corresponde a células ANG (CD38⁺, CD24⁻ y CD19⁺⁺) clasifica incorrectamente un 35% de células.

Además de lo anterior, observamos un patrón de expresión bimodal de CD21 en la población de LB transicionales (Figura 18, página 90). Este patrón ha sido previamente descrito y permite diferenciar dos estadios funcionalmente diferentes, denominados CD21^{+lo} o tipo T1 y CD21^{+hi} o tipo T2 (Suryani et al. 2010). Se ha observado que tras una terapia de depleción B, el inicio de la reconstitución B está marcado por la aparición de células transicionales con fenotipo CD21^{+lo}, representando por tanto un estadio más inmaduro que las CD21^{+hi} o T2. Estas células de tipo T1 poseen un mayor componente autorreactivo. Se postula que a este nivel se mantiene el proceso de selección negativa que afecta a las células inmaduras en MO (Suryani et al. 2010; Vossenkamper, Lutalo, y Spencer 2012; Wardemann et al. 2003; Wardemann y Nussenzweig 2007). Este hecho es consistente con el hallazgo de células T1 aumentadas en pacientes diagnosticados de LES (Anolik, Barnard, et al. 2007; Sims et al. 2005).

En resumen, el análisis de las moléculas CD19, CD38, CD24, CD27, IgM e IgD permite caracterizar adecuadamente la heterogeneidad del compartimento de linfocitos B, a lo largo de su proceso de diferenciación, a excepción de la subpoblación de LB anérgicos, que requiere la inclusión de CD21 para su adecuada identificación.

Con respecto al CD10, su principal utilidad es la identificación de células precursoras e inmaduras, así como células de centro germinal (Tabla 36). Estas poblaciones son perfectamente identificables con el panel estructural utilizado, sin necesidad de utilizar CD10 (Figura 16). Sin embargo, su inclusión resulta útil en estudios realizados sobre tejido linfoide para cribaje de Síndrome Linfoproliferativo Crónico B. En combinación con CD20, identifica fácilmente células de CG (CD10⁺, CD20⁺⁺) (Figura 22, página 100). Tal como hemos mostrado, el centro germinal es susceptible de presentar clonalidad de carácter no neoplásico. En 9 muestras analizadas de PAAF correspondientes a áreas hipoecoicas de tiroides, observamos que la clonalidad observada en linfocitos B se circunscribía a la población de CG (Tabla 31), no tratándose de infiltración neoplásica. Datos similares están descritos en la literatura (Chen et al. 2006; Kussick et al. 2004; Reichard, McKenna, y Kroft 2003). Por tanto, *el uso del*

marcador CD10 para la identificación de células de centro germinal es útil en los estudios de cribaje de SLP crónico B en tejido linfoide, ya que es una población susceptible de presentar clonalidad de carácter no neoplásico. Además, el CD10 constituye un marcador de primera línea en el diagnóstico diferencial de neoplasias de células B maduras, ya que permite diferenciar entidades como Linfoma folicular (CD10⁺ en el 85% de los casos), Linfoma difuso de células grandes B (DLBCL, CD10⁺ en el 35% de los casos) y Linfoma de Burkitt (BL) (Demurtas et al. 2013; Freedman 2015; Leach, Drummond, y Doig 2013; Sabbatini et al. 2010).

2. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES B EN EL SEGUIMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES TRATADAS CON RITUXIMAB

2.1. Patrón de reconstitución B tras la administración de Rituximab

Aplicando el protocolo de citometría de alta sensibilidad, hemos estudiado 72 muestras de SP de 33 pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con Rituximab. Al igual que los trabajos de referencia sobre la cinética de reconstitución B post-Rx (Leandro et al. 2006; Roll et al. 2006), hemos identificado una fase de depleción y otra de reconstitución B.

Tras la administración de Rx se induce la eliminación casi total de los LB en SP. La fase inicial de depleción está marcada por el descenso de los LB por debajo de 5 cels/ μ L, umbral definido por primera vez por Looney et. al en 2004 y globalmente aceptado por otros autores para considerar efectiva una depleción (Adlowitz et al. 2015; Anolik, Friedberg, et al. 2007; Leandro 2013; Venhoff et al. 2014). En nuestro estudio observamos claramente una intensa depleción de linfocitos B ($M_e = 0.16$ LB/ μ L), donde el total de las muestras analizadas en esta etapa presentaron valores inferiores al umbral teórico establecido.

La fase de reconstitución B post Rituximab está marcada por la aparición de células con un perfil transicional con fenotipo CD38⁺⁺ y CD24⁺⁺. Después la proporción de células transicionales decrece progresivamente mientras que la

proporción de células vírgenes, con menor expresión de CD38 y CD24, se incrementa. La recuperación del resto de subpoblaciones marca el final del proceso (Adlowitz et al. 2015; Anolik, Friedberg, et al. 2007; Leandro et al. 2006; Roll et al. 2006). Esta cinética de reconstitución es muy parecida a la reconstitución post-trasplante hematopoyético (Bemark et al. 2012; Marie-Cardine et al. 2008). Gracias a las investigaciones realizadas en pacientes trasplantados con precursores hematopoyéticos, se demuestra que las células transicionales son un paso necesario para la regeneración de todos los linfocitos B maduros (Marie-Cardine et al. 2008).

Siguiendo la evolución de las células transicionales hacia células vírgenes hemos establecido una clasificación de la reconstitución B en 4 etapas (Tabla 33, página 107). La etapa 1 es la fase de depleción anteriormente descrita. En la etapa 2 se inicia la repoblación B, marcada por un aumento de las células transicionales por encima de valores normales (>6%). En este punto la reconstitución se encuentra en una fase muy temprana y las células transicionales aún no han iniciado el proceso de maduración hacia células vírgenes (no detectadas en la etapa 1, y por debajo del límite inferior de la normalidad (27.1%) en la etapa 2). A partir de este punto, observamos un aumento progresivo de células vírgenes, y con ellas del resto de subpoblaciones B. La diferencia entre las etapas 3 y 4 radica en la actividad medular, frenada durante la etapa 4, lo que provoca un descenso de la cantidad de transicionales (de 30.06 en la etapa 3 a 7.51 cels/ μ L en la etapa 4) y un descenso de la ratio con las células vírgenes (menos de 0.25) (Figura 25, página 109). Al igual que en nuestro estudio, Adlowitz et al. define que la cinética de reconstitución B evoluciona en función de las proporciones de células transicionales/vírgenes, para lo cual se precisa de un panel completo de marcadores que permita diferenciar entre éstas y el resto de subpoblaciones CD27⁻ (Adlowitz et al. 2015).

Es importante destacar que el patrón de reconstitución previamente descrito ha sido similar en todas las enfermedades estudiadas (Tabla 13, página 51). No se observaron patrones específicos para un diagnóstico concreto (Tabla 32, página 105). Esta observación está en sintonía con otros trabajos, que describen un patrón similar de reconstitución post-Rx para diferentes

enfermedades; AR (Adlowitz et al. 2015; Leandro et al. 2006; Roll et al. 2006), LES (Anolik, Barnard, et al. 2007) vasculitis asociada a ANCA (Venhoff et al. 2014) e incluso pacientes hematológicos sin enfermedad autoinmune diagnosticada (Anolik, Friedberg, et al. 2007; Marie-Cardine et al. 2008).

Con las etapas anteriormente definidas, estudiamos la cantidad total de linfocitos B y el tiempo post tratamiento correspondientes a cada etapa. Aunque ambos parámetros aumentan con las etapas (Figura 26, página 110), existe una gran variabilidad de casos. Por ejemplo, con respecto al nº de LB, encontramos muestras con tan solo 8 LB/ μ L en la etapa 4 (AR4.a) mientras que otras muestras presentaban 89 LB/ μ L en la etapa 2 (O3.b) (Tabla 32, página 105). En este último caso se observa una aparente recuperación de la cantidad de LB, pero el 90.33% correspondía a células inmaduras con fenotipo transicional. Es decir, recuperar la cantidad de LB/ μ L no implica una recuperación de las proporciones del conjunto de subpoblaciones que componen el compartimento B. Esta es la causa por la que en muchos estudios no se demuestra una asociación clara entre la cantidad de LB y la clínica de la enfermedad (Cambridge et al. 2014). Por ello creemos que una clasificación por etapas basada en la distribución de subpoblaciones ilustra mejor la realidad funcional del compartimento B que el tiempo post-Rx o la cantidad de LB. Hemos identificado un grupo de pacientes (AR5, AR10, PV1 y O2) con una cinética de reconstitución excesivamente demorada con respecto al resto (Figura 24, página 93). Otros autores, que describen hallazgos similares, proponen un daño de las células del estroma de la medula ósea a cargo del Rituximab como posible explicación de este fenómeno (Venhoff et al. 2014).

Hemos identificado que el compartimento B de memoria, especialmente las células M-NS CD27⁺, es el que más lentamente se recupera. En ningún caso se llegaron a recuperar los valores normales de células MS CD27⁺ ($M_e = 1.68$, rango normal 14-54 cels/ μ L) ni de células M-NS CD27⁺ ($M_e = 0.74$, rango normal 19-191 cels/ μ L, Figura 25, página 109). Existen numerosos datos en la literatura sobre complicaciones infecciosas asociadas a tratamiento previo con Rx atribuidas a anomalías inmunológicas. Uno de los primeros informes mostró que los pacientes tratados con Rituximab presentaban una tasa de infecciones graves 1,4 veces superior durante las 24 semanas después del tratamiento en

comparación con placebo (S. B. Cohen et al. 2006; Kaplan et al. 2014). También se ha demostrado que múltiples ciclos de Rituximab aumentan el riesgo de hipogammaglobulinemia e infecciones graves. La expansión de células B funcionalmente inmaduras, como son las células transicionales, y la disminución de células B memoria pueden contribuir a un estado inmunodeficiente, en particular, en pacientes que reciben dosis repetidas de Rituximab (Anolik, Friedberg, et al. 2007). La citometría se presenta por tanto como una herramienta útil para identificar pacientes con una reconstitución B anómala.

2.2. Subpoblaciones B persistentes tras tratamiento con Rituximab

Tal y como se explica en el apartado anterior las células transicionales son un paso necesario para la regeneración de todos los linfocitos B maduros (Marie-Cardine et al. 2008). Por lo tanto, tras una depleción linfocitaria, en fases tempranas de la repoblación, las células detectadas que no sean transicionales probablemente corresponden a células resistentes al tratamiento. La citometría de alta sensibilidad nos permite analizar la fase de depleción en busca de estas células. Al igual que otros autores, identificamos que principalmente persisten plasmablastos, debido a su baja expresión de CD20 (Dass et al. 2008; Leandro 2013; Vital et al. 2010). Pero además, en menor medida, persisten células MS CD27⁺ ($M_e = 5.57\%$ y $0.0245 \text{ LB}/\mu\text{L}$), MS CD27⁻ ($M_e = 1.24\%$ y $0.0040 \text{ LB}/\mu\text{L}$) y M-NS CD27⁺ ($M_e = 1.30\%$ y $0.0055 \text{ LB}/\mu\text{L}$). Estos datos están en línea con los trabajos que aplican una sensibilidad de 10^{-5} (Adlowitz et al. 2015). Se desconoce la razón por la que las células B memoria son capaces de resistir al tratamiento con Rx, a pesar de que su expresión de CD20 es similar a la del resto de subpoblaciones B. La única hipótesis a este respecto sería que los LB memoria permanecen en nichos inmunológicamente privilegiados en los órganos linfoides secundarios. Al encontrarse en un entorno linfopénico, podrían expandirse por un mecanismo de proliferación homeostática (Nakou et al. 2009), Otras subpoblaciones, como las células vírgenes y células transicionales, dependerían de numerosos factores de supervivencia para su desarrollo y serían por tanto más sensibles a la acción del Rx (Kamburova et al. 2012; Suryani et al. 2010).

Observamos diferencias importantes entre muestras en la composición de las subpoblaciones B persistentes al Rx (Tabla 35, página 115): identificamos muestras con total ausencia de LB (p. ej. AR5.a), con plasmablastos como principal población persistente (p. ej. AR18.a), con LB MS CD27⁺ como principal población persistente (p. ej. O2.b) o con LB MS-CD27⁺ y plasmablastos persistiendo conjuntamente (p. ej. AR10.c). Hemos identificado una estrecha relación entre las proporciones de plasmablastos y LB MS CD27⁺ (Figura 27, $p < 0.0001$, $R = -0.88$), es decir, el aumento de LB MS CD27⁺ disminuye el porcentaje de plasmablastos en la fase de depleción, lo que demuestra que ambas poblaciones constituyen la mayoría de las células persistentes post-Rx. También es importante destacar que en esta fase el porcentaje de células MS CD27⁺ es superior al de células M-NS CD27⁺, a diferencia de lo que ocurre en controles (Figura 28, página 112). No existe una teoría que explique la persistencia selectiva de LB MS CD27⁺.

Con respecto a la relación existente entre LB persistentes a la acción del Rx y evolución clínica, la Tabla 37 muestra que las principales subpoblaciones asociadas con la evolución clínica tras tratamiento con Rx son precisamente los plasmablastos y las células MS CD27⁺. En el caso de los plasmablastos se ha establecido el umbral de 0.8 cels/ μ L post-Rx para predecir una respuesta clínica en pacientes diagnosticados de LES (Vital, Dass, et al. 2011). En nuestros datos, en fase de depleción, detectamos 23/24 (95%) muestras por debajo de ese umbral donde en 4 de ellas no había plasmablastos, únicamente la muestra AR2.c presentó valores superiores al umbral (0.933 cels/ μ L).

Otros autores (Brezinschek et al. 2012; Sellam et al. 2011a; Venhoff et al. 2014) muestran diferencias importantes en el porcentaje de LB MS CD27⁺ en pacientes no respondedores a la acción del Rx. En este sentido hemos identificado muestras con un elevado porcentaje de MS CD27⁺ y valores inferiores a 0.8 plasmablastos/ μ L (p. ej. AR3.a y O2.b), es decir, es posible que la cuantificación de plasmablastos como único factor predictivo sea insuficiente para determinar la evolución clínica de los pacientes post-Rx, siendo necesaria la caracterización de ambas subpoblaciones. Autores como Adlowitz et al. optan por analizar conjuntamente plasmablastos y LB MS CD27⁺. Esta

agrupación no parece óptima ya que, como hemos visto, la sensibilidad a Rx no es la misma para ambas subpoblaciones.

Tabla 37: Estudios que monitorizan por citometría las subpoblaciones B persistentes tras tratamiento con Rituximab.

Ref.	Pat.	Dosis Rx	Sensib.	Marcadores	Conclusión
Roll, Dorner, y Tony 2008	AR	2 infusiones (1000 mg)	10,000 eventos PBMC	Combinaciones de 4 colores incluyendo; CD19, IgD, CD38, CD24, CD10 y CD27	En pacientes que han respondido a Rx, las recaídas tempranas tienen el doble de LB CD27 ⁺ (40 cels/μL). Tiempo medio de 7 a 8 meses.
Moller et al. 2009	AR	2 infusiones (1000 mg)	100,000 eventos CD45+	CD19, CD3, CD27 e IgD	Pacientes no respondedores tienen valores superiores de LB con cambio de isotipo (mediana 2.6 cels/μL) a los 6 meses del tratamiento.
Vital et al. 2010	AR	2 infusiones (1000 mg)	500,000 eventos CD45+	CD19, CD3, CD38 y CD27	Administrar un segundo ciclo de Rx en no respondedores reduce la cantidad de plasmablastos (de 1.3 a 1.0 cels/μL) y LB de memoria (de 1.1 a 0.2 cels/μL) persistentes y con ello mejora la respuesta clínica. Cantidades medidas a los 6 meses.
Vital, Dass, et al. 2011	LES	2 infusiones (1000 mg)	500,000 eventos CD45+	CD19, CD3, CD38 y CD27	< 0.8 plasmablastos/μL medido a los 6 meses del inicio del tratamiento se asocian a una mejor evolución clínica
Kim et al. 2011	NMO	4 infusiones (375 mg/m ²)	No especificado	CD19, CD27	No se observan recaídas en pacientes con < 0.05% de LB memoria analizados en la población linfomonocitaria.
Sellam et al. 2011a	AR	2 infusiones (1000 mg)	100,000 eventos CD45+	CD19, IgD, CD38, CD27,	Pacientes sin respuesta a los 6 meses del tratamiento tienen porcentajes mayores de LB con cambio de isotipo (21 vs 16%).
Brezinschek et al. 2012	AR	2 infusiones (1000 mg)	500,000 eventos CD45+	CD19, CD3, IgD, CD24, CD27, CD38, CD80, CD95	Pacientes no respondedores tienen porcentajes aumentados de LB memoria con cambio de isotipo CD95 ⁺ (52 vs 42%) a los 6 meses del tratamiento.
Venhoff et al. 2014	AR	2 infusiones (1000 mg) o 2 infusiones (500 mg)	10,000 eventos CD19+	CD19, IgD, IgM, IgA, CD27, CD24, CD38, CD10 y CD21	Pacientes no respondedores tienen porcentajes aumentados de LB memoria con cambio de isotipo (52 vs 8%) y plasmablastos (24 vs 3%) durante el inicio de la reconstitución B.
Adlowitz et al. 2015	AR	2 infusiones (1000 mg)	Entre 500,000 y 5 millones de PBMC	IgD, CD19, CD3, CD38, CD24, CD27, CD21, MTG y otros marcadores de activación y viabilidad	Pacientes no respondedores tienen porcentajes aumentados de LB memoria CD95 ⁺ con cambio de isotipo y plasmablastos (estudiados conjuntamente) (70 vs 30% de CMN) a los 4 meses del tratamiento
Colucci et al. 2016	SNI	Infusiones de 375 mg/m ² en función de la clínica	50,000 eventos linfocitos	CD19, CD3, CD27, CD38, CD24, IgD e IgM.	La recuperación tanto en porcentaje como en cels/μL de los LB memoria con cambio de isotipo a los 9 meses de tratamiento es un factor predictivo de recaída.

Ref, referencia. Pat, patología. Sensib, sensibilidad. AR, artritis reumatoide. LES, lupus eritematoso sistémico. NMO, neuromielitis óptica. SIN, síndrome nefrótico idiopático. CMN, células mononucleares de sangre periférica aisladas en gradiente de densidad.

Analizamos el DAS28 en pacientes diagnosticados de AR para cada una de las fases de reconstitución. No se obtuvieron correlaciones significativas para ninguna de las subpoblaciones B en las etapas 2, 3 y 4. Sin embargo, en la fase de depleción se encontró una correlación significativa entre el nº de LB/ μ L y el valor de DAS28 para las subpoblaciones MS CD27⁺, MS CD27⁻, y plasmablastos/células plasmáticas (Figura 29, página 117). Estos resultados están en sintonía con los estudios que analizan una gran cantidad de eventos (500,000 o más, Tabla 37).

No encontramos correlación entre las células M-NS CD27⁺ y los datos clínicos para ninguna de las etapas estudiadas. El análisis combinado del conjunto de células CD27⁺ (con y sin cambio de isotipo, incluyendo MS y M-NS) mantiene una correlación significativa con el DAS aunque con menor fuerza que en el análisis individual de las MS CD27⁺. Por el contrario, el análisis conjunto de células con cambio de isotipo (incluyendo tanto MS CD27⁺ como CD27⁻ y excluyendo las M-NS CD27⁺) mejora la fuerza de asociación con la clínica. Hay que destacar que no hemos identificado ninguna asociación clínica post-Rx con las células M-NS o células de memoria dobles positivas IgM⁺/IgD⁺ relacionadas con la zona marginal del bazo, análogamente a otros autores (Tabla 37). Tal como se explica en la página 26, se trata de un subconjunto de células único en la especie humana, cuya maduración es independiente del centro germinal y cuya tasa de autorreactividad es muy baja (Weill, Weller, y Reynaud 2009). Por ello, consideramos que es importante incluir IgD e IgM en los paneles de citometría, con el fin de diferenciar el compartimento “*memory switch*” (doble negativo), que se relaciona con la evolución clínica post-tratamiento, del compartimento “*memory no-switch*” (doble positivo), que no presenta asociación clínica. Tanto la función como el desarrollo de ambas poblaciones parece ser muy diferentes (Lanzavecchia y Sallusto 2009; Weill, Weller, y Reynaud 2009). Esto podría reducir la variabilidad de resultados interlaboratorio para futuros estudios. En resumen, *el panel de marcadores para monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab en pacientes con enfermedades autoinmunes debe permitir la identificación fiable de la subpoblación de LB memoria CD27⁺ que ha realizado cambio de isotipo, junto*

a la de plasmablastos, por lo que debe incluir los marcadores CD19, CD38, CD24, CD27, IgM e IgD, además del marcador de exclusión CD3.

Debido a que la eficacia del Rituximab depende de su capacidad para eliminar LB autorreactivos, existe la teoría de que las células resistentes pueden convertirse en células dominantes durante la repoblación B (Adlowitz et al. 2015; Colucci et al. 2016; Schreiber et al. 2017). Mediante el análisis de expresión de Ki-67 (proteína nuclear necesaria para la proliferación celular) Aldowitz et al. demostraron que los LB residuales tienen capacidad de proliferar homeostáticamente. Estudios recientes en artritis reumatoide han demostrado que las recaídas clínicas se producen principalmente una vez se ha iniciado la reconstitución B (Venhoff et al. 2014), siendo los LB memoria con cambio de isotipo las principales células asociadas con la clínica de la enfermedad (Tabla 37). En nuestro trabajo encontramos un paciente con pénfigo vulgar con una recaída confirmada tras el tratamiento con Rx. En la Figura 32 se muestra la composición de los linfocitos B del paciente (PV1) en las Etapas 2 y 4 (las características completas se detallan en Tabla 32, página 105) (no existen datos disponibles para las Etapas 1 y 3). Con una cinética de reconstitución claramente demorada (inicio de repoblación a los 16 meses con un total de 6.88 LB/ μ L), en el análisis de subpoblaciones B en la etapa 2 se observó un 53% de LB memoria con cambio de isotipo, tanto CD27⁺ (47%) como CD27⁻ (6%), junto con un 10% de plasmablastos. Meses después y como consecuencia de la reconstitución, se observa un descenso de células transicionales y un aumento de células vírgenes en la etapa 4. En esta misma etapa se mantienen los valores de MS (de 3.6 LB/ μ L en la etapa 2 a 2.3 LB/ μ L en la etapa 4), mientras que la cantidad de plasmablastos aumenta (de 0.7 LB/ μ L en la etapa 2 a 2.7 LB/ μ L en la etapa 4). El mes +35 el paciente sufrió una recaída clínica para la cual se infundió una nueva dosis de Rx. Se trataría de un ejemplo de reconstitución B con un claro predominio de células memoria. Las características descritas y la evolución de PV1 encajan con las teorías actualmente propuestas y anteriormente descritas (Adlowitz et al. 2015; Colucci et al. 2016; Schreiber et al. 2017).

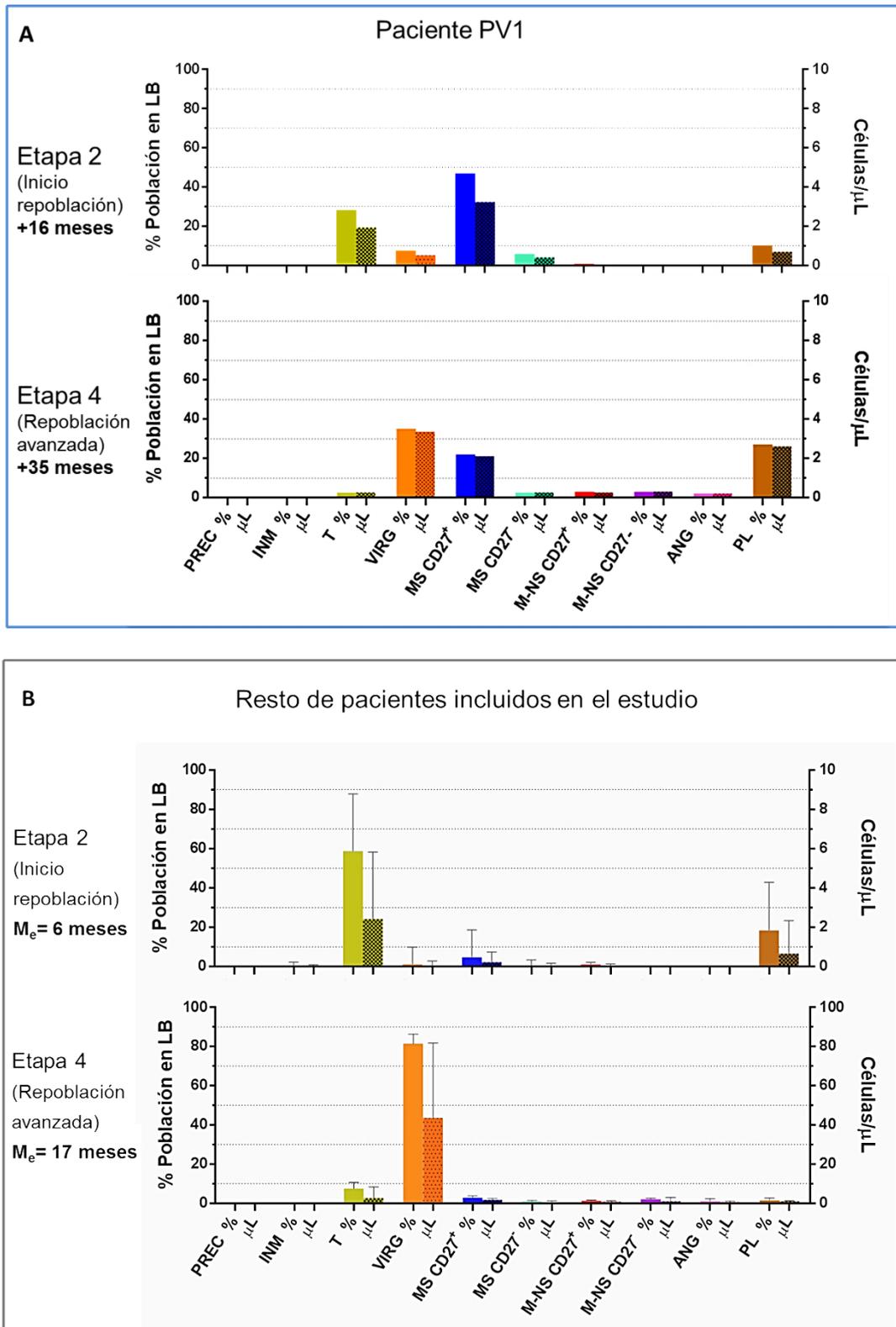


Figura 32: Reconstitución B post Rituximab en paciente PV1 (A), comparado con el resto de muestras del estudio (B). PREC, precursoras. INM, inmaduras. T, transicionales. VIRG, vírgenes. MS CD27⁺, células B de memoria con cambio de isotipo. MS CD27⁻, células B de memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27. M-NS CD27⁺, células B memoria sin cambio de isotipo. M-NS CD27⁻, células B memoria sin cambio de isotipo ni expresión de CD27. ANG, linfocitos B anérgicos. PL, células plasmáticas. Las barras oscuras en cada color representan los valores absolutos de células por microlitro de sangre.

2.3. Cuándo realizar la monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab

El principal objetivo del análisis post-Rx es la identificación de biomarcadores celulares (subpoblaciones B) implicados en la respuesta a Rx y la evolución clínica posterior de la enfermedad. Tal como hemos descrito en el apartado anterior, la identificación de LB persistentes a la acción del Rituximab debe realizarse en la etapa inicial de depleción, cuando los LB se encuentran por debajo de 5 LB/ μ L, y no se ha producido todavía la emergencia de células transicionales (Figura 25, página 109). A partir de la Etapa 2 existe una elevada proporción tanto de células transicionales como de células vírgenes, que enmascaran y dificultan el análisis de las restantes subpoblaciones. Sólo se obtuvieron correlaciones significativas entre la clínica y las subpoblaciones B persistentes en la fase de depleción (Figura 29, página 117). El análisis inmediatamente posterior a la administración con Rx se ha demostrado poco efectivo (Brezinschek et al. 2012). Parece que el análisis de subpoblaciones se debe realizar después de dejar un periodo en el que se permita una potencial recuperación homeostática de las células persistentes, antes de que se inicie la emergencia de células transicionales y vírgenes (Figura 33).

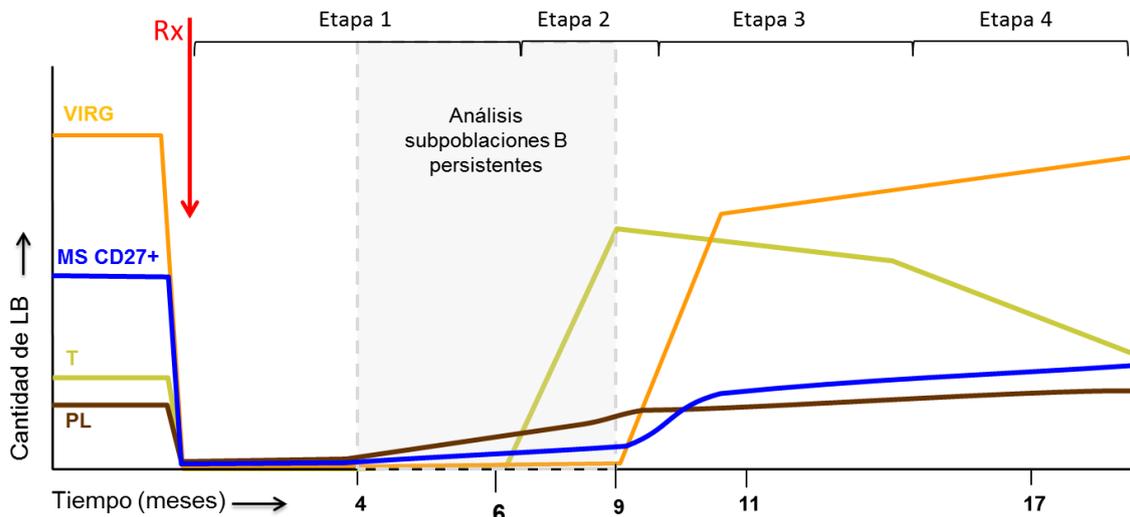


Figura 33: Esquema de la cinética de reconstitución Post-Rituximab (Rx), marcando el tiempo recomendado para el análisis de subpoblaciones B (zona en gris). Se muestran las principales poblaciones persistentes (MS CD27⁺, LB memoria con cambio de isotipo CD27⁺ y PL, plasmablastos) y las que marcan las etapas de repoblación B (T, transicionales y VIRG, vírgenes).

En nuestro estudio, no se identificaron reconstituciones anteriores a los 4 meses. La mediana de tiempo en que se alcanza la etapa 2, es decir, en que se detecta el inicio de la repoblación, fue de 6 meses. De manera similar a lo descrito para el n° de LB por microlitro de sangre, observamos una amplia variabilidad: algunos pacientes se mantuvieron en la fase de depleción hasta 14 meses (PV2.a, PV5.a) mientras que otros presentaron el patrón característico de la etapa 4 en tan solo 9 meses (AR16.a) (Figura 26, página 110). Sin embargo todas las muestras con un elevado porcentaje de células transicionales y vírgenes (etapas 3 y 4) fueron posteriores a los 6 meses post-tratamiento. En la literatura tampoco se han descrito repoblaciones anteriores a los 4 meses, siendo la media de reconstitución entre 6 y 9 meses (Adlowitz et al. 2015; M. D. Cohen and Keystone 2015; Roll et al. 2006), periodo de tiempo en el que se identifican las principales asociaciones clínicas con las subpoblaciones de LB (Tabla 37). Por lo tanto, *la monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab en pacientes con enfermedades autoinmunes debe realizarse en la etapa de depleción, en torno a los 6 meses tras el tratamiento, antes de que se inicie la reconstitución B.*

2.4. Nivel de sensibilidad de la citometría de flujo para monitorización del tratamiento con Rituximab

Puesto que el análisis de subpoblaciones B post-Rx se debe realizar en la etapa de depleción, no basta con la aplicación de citometría con sensibilidad estándar de 10^{-4} . La mera cuantificación del total de LB para determinar si se encuentra por debajo de 5 LB/ μ L no es suficiente, siendo necesaria la identificación y cuantificación tanto de plasmablastos como de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, relacionadas con la respuesta clínica.

En nuestro trabajo se adquirieron tantos leucocitos como fue posible en cada muestra, según la técnica de alta sensibilidad desarrollada, pudimos identificar y caracterizar subpoblaciones B en 19/24 muestras en fase de depleción, con una media de 416 eventos de LB analizados y 5.807.281 eventos leucocitarios adquiridos (Tabla 34, página 113). Calculamos el tamaño de *cluster* de LB teórico para una adquisición de 2, 3 y 5 millones de leucocitos (Tabla 34). Para

una adquisición teórica de 3 millones de leucocitos 17 de las 24 muestras quedarían por encima del límite de sensibilidad establecido (50 eventos), mientras que para 5 millones serían 19/24 muestras, es decir, dos muestras más. Hay que destacar que no se detectarían LB en 5 muestras a pesar de analizar 5 millones de leucocitos. Por otra parte, adquiriendo 2 millones de leucocitos no se alcanzaría el límite de 50 eventos en 10/24 (42%) muestras, para 3 millones en 7/24 (29%) y en 5/24 (21%) para 5 millones. Actualmente se ha demostrado tanto en el análisis de enfermedad mínima residual como en el de subpoblaciones B por citometría de alta sensibilidad que es posible alcanzar una precisión adecuada con menos de 5 millones de leucocitos adquiridos (Adlowitz et al. 2015; Domingo et al. 2010). En conclusión, consideramos que, *la monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab en pacientes con enfermedades autoinmunes requiere la adquisición de un mínimo de 3 millones de leucocitos para alcanzar un límite de sensibilidad suficiente, lo que implica el procesamiento de un volumen de muestra en torno a 1 mL de sangre periférica.*

Conclusiones

1. En un citómetro FACSCanto II la tasa de flujo de adquisición de muestras se puede aumentar al menos hasta 12,000 eventos por segundo sin que se afecte la calidad de los resultados obtenidos
2. La concentración celular de marcaje se puede aumentar hasta un máximo de 30 millones de células/mL sin que se afecte la precisión y exactitud de los resultados obtenidos
3. El análisis combinado de los porcentajes de células CD34+, células plasmáticas y neutrófilos en muestras de médula ósea permite evaluar su grado de hemodilución con una sensibilidad y especificidad superior al 95 %.
4. El análisis de distribución de subpoblaciones linfocitarias B en médula ósea requiere la comprobación previa de que el grado de hemodilución de la muestra se mantiene dentro de límites aceptables.
5. El análisis de las moléculas CD19, CD38, CD24, CD27, IgM e IgD permite caracterizar adecuadamente la heterogeneidad del compartimento de linfocitos B, a lo largo de su proceso de diferenciación, a excepción de la subpoblación de LB anérgicos, que requiere la inclusión de CD21 para su adecuada identificación.
6. El uso del marcador CD10 para la identificación de células de centro germinal es útil en los estudios de cribaje de SLP crónico B en tejido linfoide, ya que es una población susceptible de presentar clonalidad de carácter no neoplásico
7. El panel de marcadores para monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab en pacientes con enfermedades autoinmunes debe permitir la identificación fiable de la subpoblación de LB memoria CD27⁺ que ha

realizado cambio de isotipo, junto a la de plasmablastos, por lo que debe incluir los marcadores CD19, CD38, CD24, CD27, IgM e IgD, además del marcador de exclusión CD3.

8. La monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab en pacientes con enfermedades autoinmunes debe realizarse en la etapa de depleción, en torno a los 6 meses tras el tratamiento, antes de que se inicie la reconstitución B.
9. La monitorización por citometría del tratamiento con Rituximab en pacientes con enfermedades autoinmunes requiere la adquisición de un mínimo de 3 millones de leucocitos para alcanzar un límite de sensibilidad suficiente, lo que implica el procesamiento de un volumen de muestra en torno a 1 mL de sangre periférica.

Bibliografía

- Acharya, M et al. 2010. "CD23/FcepsilonRII: Molecular Multi-Tasking." *Clinical and experimental immunology* 162(1): 12–23.
- Adlowitz, D G et al. 2015. "Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response." *PloS one* 10(6): e0128269.
- Agematsu, K et al. 1997. "B Cell Subpopulations Separated by CD27 and Crucial Collaboration of CD27+ B Cells and Helper T Cells in Immunoglobulin Production." *European journal of immunology* 27(8): 2073–79.
- Agrawal, S, S A Smith, S G Tangye, and W A Sewell. 2013. "Transitional B Cell Subsets in Human Bone Marrow." *Clinical and experimental immunology* 174(1): 53–59.
- Aldawood, A M et al. 2015. "A Novel Method to Assess Bone Marrow Purity Is Useful in Determining Blast Percentage by Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia." *Annals of hematology & oncology* 2(5): 1038.
- Andrews, S F, and P C Wilson. 2010. "The Anergic B Cell ." *Blood* 115(24): 4976–78.
- Anolik, J H, J W Friedberg, et al. 2007. "B Cell Reconstitution after Rituximab Treatment of Lymphoma Recapitulates B Cell Ontogeny." *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 122(2): 139–45.
- Anolik, J H, J Barnard, et al. 2007. "Delayed Memory B Cell Recovery in Peripheral Blood and Lymphoid Tissue in Systemic Lupus Erythematosus after B Cell Depletion Therapy." *Arthritis and Rheumatism* 56(9): 3044–56.
- Ashcroft, Robert G., and Peter A. Lopez. 2000. "Commercial High Speed Machines Open New Opportunities in High Throughput Flow Cytometry (HTFC)." *Journal of Immunological Methods* 243(1–2): 13–24.
- Bain, B J. 2001. "Bone Marrow Aspiration ." *Journal of clinical pathology* 54(9): 657–63.
- Bemark, M, J Holmqvist, J Abrahamsson, and K Mellgren. 2012. "Translational Mini-Review Series on B Cell Subsets in Disease. Reconstitution after Haematopoietic Stem Cell Transplantation - Revelation of B Cell Developmental Pathways and Lineage Phenotypes." *Clinical & Experimental Immunology* 167(1): 15–25.
- Bene, M C, and J S Kaeda. 2009. "How and Why Minimal Residual Disease Studies Are Necessary in Leukemia: A Review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet." *Haematologica* 94(8): 1135–50.
- Berkowska, M A et al. 2011. "Human Memory B Cells Originate from Three Distinct Germinal Center-Dependent and -Independent Maturation Pathways." *Blood* 118(8): 2150–58.

- Bleesing, J J, and T A Fleisher. 2003. "Human B Cells Express a CD45 Isoform That Is Similar to Murine B220 and Is Downregulated with Acquisition of the Memory B-Cell Marker CD27." *Cytometry.Part B, Clinical cytometry* 51(1): 1–8.
- Boldt, A et al. 2014. "Eight-Color Immunophenotyping of T-, B-, and NK-Cell Subpopulations for Characterization of Chronic Immunodeficiencies." *Cytometry.Part B, Clinical cytometry* 86(3): 191–206.
- Boross, P, and J H Leusen. 2012. "Mechanisms of Action of CD20 Antibodies." *American journal of cancer research* 2(6): 676–90.
- Brando, B et al. 2000. "Cytofluorometric Methods for Assessing Absolute Numbers of Cell Subsets in Blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis ." *Cytometry* 42(6): 327–46.
- Breedveld, F et al. 2007. "Rituximab Pharmacokinetics in Patients with Rheumatoid Arthritis: B-Cell Levels Do Not Correlate with Clinical Response." *Journal of clinical pharmacology* 47(9): 1119–28.
- Brezinschek, H P, F Rainer, K Brickmann, and W B Graninger. 2012. "B Lymphocyte-Typing for Prediction of Clinical Response to Rituximab." *Arthritis research & therapy* 14(4): R161.
- Brooimans, R A et al. 2009. "Flow Cytometric Differential of Leukocyte Populations in Normal Bone Marrow: Influence of Peripheral Blood Contamination." *Cytometry.Part B, Clinical cytometry* 76(1): 18–26.
- Buffa, S et al. 2013. "A Novel B Cell Population Revealed by a CD38/CD24 Gating Strategy: CD38(-)CD24 (-) B Cells in Centenarian Offspring and Elderly People ." *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35(5): 2009–24.
- Cambridge, G et al. 2006. "Circulating Levels of B Lymphocyte Stimulator in Patients with Rheumatoid Arthritis Following Rituximab Treatment: Relationships with B Cell Depletion, Circulating Antibodies, and Clinical Relapse." *Arthritis and Rheumatism* 54(3): 723–32.
- . 2014. "The Effect of B-Cell Depletion Therapy on Serological Evidence of B-Cell and Plasmablast Activation in Patients with Rheumatoid Arthritis over Multiple Cycles of Rituximab Treatment." *Journal of Autoimmunity* 50: 67–76.
- Carsetti, Rita, M Manuela Rosado, and Hedda Wardmann. 2004. "Peripheral Development of B Cells in Mouse and Man." *Immunological reviews* 197(1): 179–91.
- Cerutti, A, M Cols, and I Puga. 2013. "Marginal Zone B Cells: Virtues of Innate-like Antibody-Producing Lymphocytes ." *Nature reviews.Immunology* 13(2): 118–32.
- Charles, E D et al. 2011. "Clonal B Cells in Patients with Hepatitis C Virus-Associated Mixed Cryoglobulinemia Contain an Expanded Anergic

- CD21^{low} B-Cell Subset.” *Blood* 117(20): 5425–37.
- Cheminant, M et al. 2015. “Minimal Residual Disease Monitoring by 8-Color Flow Cytometry in Mantle Cell Lymphoma: An EU-MCL and LYSA Study.” *Haematologica*.
- Chen, H I et al. 2006. “Restricted Kappa/lambda Light Chain Ratio by Flow Cytometry in Germinal Center B Cells in Hashimoto Thyroiditis.” *American Journal of Clinical Pathology* 125(1): 42–48.
- Cohen, M D, and E Keystone. 2015. “Rituximab for Rheumatoid Arthritis.” *Rheumatology and therapy* 2(2): 99–111.
- Cohen, S B et al. 2006. “Rituximab for Rheumatoid Arthritis Refractory to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy: Results of a Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating Primary Efficacy and Safety at Twenty-Four Weeks.” *Arthritis and Rheumatism* 54(9): 2793–2806.
- Colombo, M et al. 2013. “Expression of Ig Receptors with Distinctive Features Indicating Antigen Selection by Marginal Zone B Cells from Human Spleen.” *Molecular medicine*.
- Colucci, M et al. 2016. “B Cell Reconstitution after Rituximab Treatment in Idiopathic Nephrotic Syndrome.” *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 27(6): 1811–22.
- Cooper, M D. 1987. “Current Concepts. B Lymphocytes. Normal Development and Function.” *The New England journal of medicine* 317(23): 1452–56.
- Craig, F E, and K A Foon. 2008. “Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms.” *Blood* 111(8): 3941–67.
- Cuss, A K et al. 2006. “Expansion of Functionally Immature Transitional B Cells Is Associated with Human-Immunodeficient States Characterized by Impaired Humoral Immunity .” *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176(3): 1506–16.
- Cvetkovic, R S, and C M Perry. 2006. “Rituximab: A Review of Its Use in Non-Hodgkin’s Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia.” *Drugs* 66(6): 791–820.
- Dass, S et al. 2008. “Highly Sensitive B Cell Analysis Predicts Response to Rituximab Therapy in Rheumatoid Arthritis.” *Arthritis and Rheumatism* 58(10): 2993–99.
- Davis, Bruce H et al. 2013. “Validation of Cell-Based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS - Part II - Preanalytical Issues.” *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 84(5): 286–90.
- Demurtas, A et al. 2013. “Tissue Flow Cytometry Immunophenotyping in the Diagnosis and Classification of Non-Hodgkin’s Lymphomas: A

- Retrospective Evaluation of 1,792 Cases.” *Cytometry.Part B, Clinical cytometry* 84(2): 82–95.
- Descatoire, M, J C Weill, C A Reynaud, and S Weller. 2011. “A Human Equivalent of Mouse B-1 Cells?” *The Journal of experimental medicine* 208(13): 2563–64.
- Domingo, E et al. 2010. “Enhanced Sensitivity of Flow Cytometry for Routine Assessment of Minimal Residual Disease .” *Haematologica* 95(4): 691–92.
- Donate, C et al. 2013. “Homing of Human B Cells to Lymphoid Organs and B-Cell Lymphoma Engraftment Are Controlled by Cell Adhesion Molecule JAM-C.” *Cancer research* 73(2): 640–51.
- Dorner, T. 2006. “Crossroads of B Cell Activation in Autoimmunity: Rationale of Targeting B Cells.” *The Journal of rheumatology.Supplement* 77: 3–11.
- Ehrhardt, G R et al. 2005. “Expression of the Immunoregulatory Molecule FcRH4 Defines a Distinctive Tissue-Based Population of Memory B Cells.” *The Journal of experimental medicine* 202(6): 783–91.
- Eming, Rüdiger et al. 2008. “Rituximab Exerts a Dual Effect in Pemphigus Vulgaris .” *Journal of Investigative Dermatology* 128(12): 2850–58.
- Fearon, D T. 1993. “The CD19-CR2-TAPA-1 Complex, CD45 and Signaling by the Antigen Receptor of B Lymphocytes.” *Current opinion in immunology* 5(3): 341–48.
- Fearon, D T, and R H Carter. 1995. “The CD19/CR2/TAPA-1 Complex of B Lymphocytes: Linking Natural to Acquired Immunity.” *Annual Review of Immunology* 13: 127–49.
- Fecteau, J F, G Cote, and S Neron. 2006. “A New Memory CD27-IgG+ B Cell Population in Peripheral Blood Expressing VH Genes with Low Frequency of Somatic Mutation.” *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177(6): 3728–36.
- Fox, L M et al. 2013. “Expression of CD1c Enhances Human Invariant NKT Cell Activation by Alpha-GalCer.” *Cancer immunity* 13: 9.
- Frébet, Elise et al. 2011. “A GEIL Flow Cytometry Consensus Proposal for Quantification of Plasma Cells: Application to Differential Diagnosis between MGUS and Myeloma.” *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 80B(3): 176–85.
- Freedman, Arnold. 2015. “Follicular Lymphoma: 2015 Update on Diagnosis and Management.” *American Journal of Hematology* 90(12): 1171–78.
- Giesecke, C et al. 2014. “Tissue Distribution and Dependence of Responsiveness of Human Antigen-Specific Memory B Cells.” *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192(7): 3091–3100.

- Gupta, R et al. 2009. "Flow Cytometric Immunophenotyping and Minimal Residual Disease Analysis in Multiple Myeloma ." *American Journal of Clinical Pathology* 132(5): 728–32.
- Gurcan, H M et al. 2009. "A Review of the Current Use of Rituximab in Autoimmune Diseases." *International immunopharmacology* 9(1): 10–25.
- Harvey Motulsky, M D. 2010. "Introducing Confidence Intervals." In *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*, Oxford University, 47–53.
- Holdrinet, R S, J von Egmond, J M Wessels, and C Haanen. 1980. "A Method for Quantification of Peripheral Blood Admixture in Bone Marrow Aspirates." *International Society for Experimental Hematology* 8(1): 103–7.
- Ibrahim, Sherrif F., and Ger Van Den Engh. 2003. "High-Speed Cell Sorting: Fundamentals and Recent Advances." *Current Opinion in Biotechnology* 14(1): 5–12.
- Isaak, A, J Prechl, J Gergely, and A Erdei. 2006. "The Role of CR2 in Autoimmunity." *Autoimmunity* 39(5): 357–66.
- Isnardi, I et al. 2010. "Complement Receptor 2/CD21- Human Naive B Cells Contain Mostly Autoreactive Unresponsive Clones." *Blood* 115(24): 5026–36.
- Jackson, Stephen M, Patrick C Wilson, Judith A James, and J D Capra. 2008. "Chapter 5 Human B Cell Subsets." In *Advances in Immunology*, ed. K Frank Austen Frederick W. Alt Tasuku Honjo, Fritz Melchers, Jonathan W.Uhr and Emil R.Unanue. Academic Press, 151–224.
- Johansson, Ulrika et al. 2014. "Guidelines on the Use of Multicolour Flow Cytometry in the Diagnosis of Haematological Neoplasms." *British journal of haematology* 165(4): 455–88.
- Johnsen, H E et al. 2014. "Cell of Origin Associated Classification of B-Cell Malignancies by Gene Signatures of the Normal B-Cell Hierarchy ." *Leukemia & lymphoma* 55(6): 1251–60.
- Kalina, T et al. 2012. "EuroFlow Standardization of Flow Cytometer Instrument Settings and Immunophenotyping Protocols ." *Leukemia* 26(9): 1986–2010. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.122>.
- Kamburova, E. G. et al. 2012. "In Vitro Effects of Rituximab on the Proliferation, Activation and Differentiation of Human B Cells." *American Journal of Transplantation* 12(2): 341–50.
- Kaplan, B et al. 2014. "Rituximab and Immune Deficiency: Case Series and Review of the Literature." *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 2(5): 594–600.
- Kasperkiewicz, M et al. 2012. "Efficacy and Safety of Rituximab in Pemphigus:

- Experience of the German Registry of Autoimmune Diseases.” *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 10(10): 727–32.
- Kim, Su-Hyun et al. 2011. “Repeated Treatment with Rituximab Based on the Assessment of Peripheral Circulating Memory B Cells in Patients with Relapsing Neuromyelitis Optica over 2 Years.” *Archives of neurology* 68(11): 1412–20.
- Kjeldsen, M K et al. 2011. “Multiparametric Flow Cytometry for Identification and Fluorescence Activated Cell Sorting of Five Distinct B-Cell Subpopulations in Normal Tonsil Tissue .” *American Journal of Clinical Pathology* 136(6): 960–69.
- Klein, U, K Rajewsky, and R Kuppers. 1998. “Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells .” *The Journal of experimental medicine* 188(9): 1679–89.
- Koelsch, K et al. 2007. “Mature B Cells Class Switched to IgD Are Autoreactive in Healthy Individuals.” *The Journal of clinical investigation* 117(6): 1558–65.
- Kussick, S J, M Kalnoski, R M Braziel, and B L Wood. 2004. “Prominent Clonal B-Cell Populations Identified by Flow Cytometry in Histologically Reactive Lymphoid Proliferations.” *American Journal of Clinical Pathology* 121(4): 464–72.
- Kverneland, A H et al. 2016. “Age and Gender Leucocytes Variances and References Values Generated Using the Standardized ONE-Study Protocol.” *Cytometry.Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 89(6): 543–64.
- Lanzavecchia, A, and F Sallusto. 2009. “Human B Cell Memory.” *Current opinion in immunology* 21(3): 298–304.
- Lazarus, M N et al. 2012. “B-Cell Numbers and Phenotype at Clinical Relapse Following Rituximab Therapy Differ in SLE Patients according to Anti-dsDNA Antibody Levels.” *Rheumatology (Oxford, England)* 51(7): 1208–15.
- Leach, Mike, Mark Drummond, and Allyson Doig. 2013. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. John Wiley & Sons.
- Leandro, M J. 2013. “B-Cell Subpopulations in Humans and Their Differential Susceptibility to Depletion with Anti-CD20 Monoclonal Antibodies.” *Arthritis research & therapy* 15 Suppl 1: S3.
- Leandro, M J, G Cambridge, M R Ehrenstein, and J C Edwards. 2006. “Reconstitution of Peripheral Blood B Cells after Depletion with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis.” *Arthritis and Rheumatism* 54(2): 613–20.

- LeBien, T W, and T F Tedder. 2008. "B Lymphocytes: How They Develop and Function ." *Blood* 112(5): 1570–80.
- Lim, S H et al. 2010. "Anti-CD20 Monoclonal Antibodies: Historical and Future Perspectives." *Haematologica* 95(1): 135–43.
- Liu, Y J, and C Arpin. 1997. "Germinal Center Development ." *Immunological reviews* 156: 111–26.
- Loken, Michael R et al. 2008. "Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: Report from a Working Conference." *Leukemia research* 32(1): 5–17. [http://www.ljournal.com/article/S0145-2126\(07\)00142-7/abstract](http://www.ljournal.com/article/S0145-2126(07)00142-7/abstract).
- . 2009. "Normalization of Bone Marrow Aspirates for Hemodilution in Flow Cytometric Analyses." *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 76B(1): 27–36.
- Lopez-Gonzalez, M A, B Sanchez, F Mata, and F Delgado. 1998. "Tonsillar Lymphocyte Subsets in Recurrent Acute Tonsillitis and Tonsillar Hypertrophy." *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 43(1): 33–39.
- Maecker, H T, J P McCoy, and R Nussenblatt. 2012. "Standardizing Immunophenotyping for the Human Immunology Project." *Nature reviews.Immunology* 12(3): 191–200.
- Manetti, M et al. 2013. "Differential Expression of Junctional Adhesion Molecules in Different Stages of Systemic Sclerosis." *Arthritis and Rheumatism* 65(1): 247–57.
- Marie-Cardine, A et al. 2008. "Transitional B Cells in Humans: Characterization and Insight from B Lymphocyte Reconstitution after Hematopoietic Stem Cell Transplantation ." *Clinical immunology* 127(1): 14–25.
- Martin Mola, E et al. 2011. "Consensus on the Use of Rituximab in Rheumatoid Arthritis. A Document with Evidence-Based Recommendations. Grupo de Expertos En Rituximab." *Reumatologia clinica* 7(1): 30–44.
- McIntosh, G G et al. 1999. "NCL-CD10-270: A New Monoclonal Antibody Recognizing CD10 in Paraffin-Embedded Tissue." *The American journal of pathology* 154(1): 77–82.
- Meru, Nadine, Andreas Jung, Irith Baumann, and Gerald Niedobitek. 2002. "Expression of the Recombination-Activating Genes in Extrafollicular Lymphocytes but No Apparent Reinduction in Germinal Center Reactions in Human Tonsils." *Blood* 99(2): 531–37.
- Moller, B et al. 2009. "Class-Switched B Cells Display Response to Therapeutic B-Cell Depletion in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis research & therapy* 11(3): R62.
- Morbach, H, E M Eichhorn, J G Liese, and H J Girschick. 2010. "Reference

- Values for B Cell Subpopulations from Infancy to Adulthood.” *Clinical & Experimental Immunology* 162(2): 271–79.
- Murphy, K, P Travers, and M Walport. 2009. “Desarrollo Y Supervivencia de Linfocitos.” In *Inmunología de Janeway*, México: Mc Graw Hill, 269.
- Nakou, M et al. 2009. “Rituximab Therapy Reduces Activated B Cells in Both the Peripheral Blood and Bone Marrow of Patients with Rheumatoid Arthritis: Depletion of Memory B Cells Correlates with Clinical Response .” *Arthritis research & therapy* 11(4): R131.
- O’Donahue, M, and L Johnson. 2016. “Lysing Methods and Reagents for Flow Cytometry Immunophenotyping Sponsored and Reviewed by ICCS Quality and Standards Committee.” (12/01). <http://www.cytometry.org/web/quality.php>.
- Ocqueteau, M et al. 1998. “Immunophenotypic Characterization of Plasma Cells from Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Patients. Implications for the Differential Diagnosis between MGUS and Multiple Myeloma .” *The American journal of pathology* 152(6): 1655–65.
- Ody, C et al. 2007. “Junctional Adhesion Molecule C (JAM-C) Distinguishes CD27+ Germinal Center B Lymphocytes from Non-Germinal Center Cells and Constitutes a New Diagnostic Tool for B-Cell Malignancies.” *Leukemia* 21(6): 1285–93.
- Paiva, B et al. 2011. “Comparison of Immunofixation, Serum Free Light Chain, and Immunophenotyping for Response Evaluation and Prognostication in Multiple Myeloma.” *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(12): 1627–33.
- Palanichamy, A et al. 2009. “Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy .” *Journal of immunology* 182(10): 5982–93.
- Pascual, M et al. 2015. “Use of Human Pharyngeal and Palatine Tonsils as a Reservoir for the Analysis of B-Cell Ontogeny in 10 Paired Samples.” *Clinical otolaryngology: official journal of ENT-UK; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*.
- Pascual, V et al. 1994. “Analysis of Somatic Mutation in Five B Cell Subsets of Human Tonsil.” *The Journal of experimental medicine* 180(1): 329–39.
- Perez-Andres, M et al. 2010. “Human Peripheral Blood B-Cell Compartments: A Crossroad in B-Cell Traffic.” *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 78B(S1): S47–60.
- Perfetto, S P et al. 2006. “Quality Assurance for Polychromatic Flow Cytometry .” *Nature protocols* 1(3): 1522–30.
- Rawstron, A C et al. 2007. “International Standardized Approach for Flow Cytometric Residual Disease Monitoring in Chronic Lymphocytic

- Leukaemia." *Leukemia* 21(5): 956–64.
- . 2008. "Report of the European Myeloma Network on Multiparametric Flow Cytometry in Multiple Myeloma and Related Disorders ." *Haematologica* 93(3): 431–38.
- Reichard, K K, R W McKenna, and S H Kroft. 2003. "Comparative Analysis of Light Chain Expression in Germinal Center Cells and Mantle Cells of Reactive Lymphoid Tissues. A Four-Color Flow Cytometric Study." *American Journal of Clinical Pathology* 119(1): 130–36.
- Ritgen, M et al. 2008. "Quantitative MRD Monitoring Identifies Distinct GVL Response Patterns after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from the GCLLSG CLL3X Trial." *Leukemia* 22(7): 1377–86.
- Roll, P et al. 2006. "Regeneration of B Cell Subsets after Transient B Cell Depletion Using Anti-CD20 Antibodies in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 54(8): 2377–86.
- Roll, P, T Dorner, and H P Tony. 2008. "Anti-CD20 Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis: Predictors of Response and B Cell Subset Regeneration after Repeated Treatment." *Arthritis and Rheumatism* 58(6): 1566–75.
- Romeu, M A et al. 1992. "Lymphocyte Immunophenotyping by Flow Cytometry in Normal Adults. Comparison of Fresh Whole Blood Lysis Technique, Ficoll-Paque Separation and Cryopreservation." *Journal of immunological methods* 154(1): 7–10.
- Saadoun, D et al. 2013. "Expansion of Autoreactive Unresponsive CD21-/low B Cells in Sjogren's Syndrome-Associated Lymphoproliferation." *Arthritis and Rheumatism* 65(4): 1085–96.
- Sabattini, E, F Bacci, C Sagramoso, and S A Pileri. 2010. "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues in 2008: An Overview." *Pathologica* 102(3): 83–87.
- Sandes, Alex F et al. 2013. "Combined Flow Cytometric Assessment of CD45, HLA-DR, CD34, and CD117 Expression Is a Useful Approach for Reliable Quantification of Blast Cells in Myelodysplastic Syndromes." *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 84B(3): 157–66.
- Sanz, I, C Wei, F E Lee, and J Anolik. 2008. "Phenotypic and Functional Heterogeneity of Human Memory B Cells ." *Seminars in immunology* 20(1): 67–82.
- Sarasquete, M E et al. 2005. "Minimal Residual Disease Monitoring in Multiple Myeloma: A Comparison between Allelic-Specific Oligonucleotide Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Flow Cytometry." *Haematologica* 90(10): 1365–72.

- Schmid, Ingrid et al. 1992. "Dead Cell Discrimination with 7-amino-actinomycin D in Combination with Dual Color Immunofluorescence in Single Laser Flow Cytometry." *Cytometry* 13(2): 204–8.
- Schreiber, K, G Nocturne, D Cornec, and C I Daien. 2017. "Lymphocytes as Biomarkers of Therapeutic Response in Rheumatic Autoimmune Diseases, Is It a Realistic Goal?" *Clinical reviews in allergy & immunology*.
- Seifert, M et al. 2009. "A Model for the Development of Human IgD-Only B Cells: Genotypic Analyses Suggest Their Generation in Superantigen Driven Immune Responses." *Molecular immunology* 46(4): 630–39.
- Seifert, M, and R Kuppers. 2009. "Molecular Footprints of a Germinal Center Derivation of Human IgM+(IgD+)CD27+ B Cells and the Dynamics of Memory B Cell Generation." *The Journal of experimental medicine* 206(12): 2659–69.
- Sellam, J et al. 2011a. "Blood Memory B Cells Are Disturbed and Predict the Response to Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 63(12): 3692–3701.
- . 2011b. "Blood Memory B Cells Are Disturbed and Predict the Response to Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis ." *Arthritis and Rheumatism* 63(12): 3692–3701.
- Shipp, M A, and A T Look. 1993. "Hematopoietic Differentiation Antigens That Are Membrane-Associated Enzymes: Cutting Is the Key!" *Blood* 82(4): 1052–70.
- Sims, G P et al. 2005. "Identification and Characterization of Circulating Human Transitional B Cells ." *Blood* 105(11): 4390–98.
- Smock, Kristi J, Sherrie L Perkins, and David W Bahler. 2007. "Quantitation of Plasma Cells in Bone Marrow Aspirates by Flow Cytometric Analysis Compared with Morphologic Assessment." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 131(6): 951–55.
- Stark, B et al. 2009. "Bone Marrow Minimal Disseminated Disease (MDD) and Minimal Residual Disease (MRD) in Childhood T-Cell Lymphoblastic Lymphoma Stage III, Detected by Flow Cytometry (FC) and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR)." *Pediatric blood & cancer* 52(1): 20–25.
- Steiniger, B et al. 1997. "The Species-Specific Structure of Microanatomical Compartments in the Human Spleen: Strongly Sialoadhesin-Positive Macrophages Occur in the Perifollicular Zone, but Not in the Marginal Zone." *Immunology* 92(2): 307–16.
- Steiniger, B, E M Timphus, R Jacob, and P J Barth. 2005. "CD27+ B Cells in Human Lymphatic Organs: Re-Evaluating the Splenic Marginal Zone." *Immunology* 116(4): 429–42.

- Stetler-Stevenson, M et al. 2007. 27. No.11 *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Aproved Guideline-2nd Edition Document H43-A2*. 2nd ed. Wayne Pennsylvania USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Strauchen, J A, and L K Miller. 2003. "Lymphoid Progenitor Cells in Human Tonsils." *International journal of surgical pathology* 11(1): 21–24.
- Streitz, M et al. 2013. "Standardization of Whole Blood Immune Phenotype Monitoring for Clinical Trials: Panels and Methods from the ONE Study." *Transplantation research* 2(1): 17.
- Suryani, S et al. 2010. "Differential Expression of CD21 Identifies Developmentally and Functionally Distinct Subsets of Human Transitional B Cells ." *Blood* 115(3): 519–29.
- Tamul, K R, J L Schmitz, K Kane, and J D Folds. 1995. "Comparison of the Effects of Ficoll-Hypaque Separation and Whole Blood Lysis on Results of Immunophenotypic Analysis of Blood and Bone Marrow Samples from Patients with Hematologic Malignancies." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2(3): 337–42.
- Tangye, S G, and K L Good. 2007. "Human IgM+CD27+ B Cells: Memory B Cells or 'memory' B Cells?" *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(1): 13–19.
- Thorarinsdottir, K et al. 2016. "CD21(-/low) B Cells in Human Blood Are Memory Cells." *Clinical and experimental immunology* 185(2): 252–62.
- Thorarinsdottir, K, A Camponeschi, I Gjertsson, and I L Martensson. 2015. "CD21 -/low B Cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease." *Scandinavian Journal of Immunology* 82(3): 254–61.
- Thorn, I et al. 2009. "Monitoring Minimal Residual Disease with Flow Cytometry, Antigen-Receptor Gene Rearrangements and Fusion Transcript Quantification in Philadelphia-Positive Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." *Leukemia research* 33(8): 1047–54.
- Thurlings, R M et al. 2010. "Clinical Response, Pharmacokinetics, Development of Human Anti-Chimaeric Antibodies, and Synovial Tissue Response to Rituximab Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(2): 409–12.
- Vaskova, M et al. 2008. "CD44 and CD27 Delineate B-Precursor Stages with Different Recombination Status and with an Uneven Distribution in Nonmalignant and Malignant Hematopoiesis." *Tissue antigens* 71(1): 57–66.
- Venhoff, N et al. 2014. "Reconstitution of the Peripheral B Lymphocyte Compartment in Patients with ANCA-Associated Vasculitides Treated with Rituximab for Relapsing or Refractory Disease." *Autoimmunity* 47(6): 401–8.

- Victora, G D, and M C Nussenzweig. 2012. "Germinal Centers." *Annual Review of Immunology* 30: 429–57.
- Vital, E M et al. 2010. "Management of Nonresponse to Rituximab in Rheumatoid Arthritis: Predictors and Outcome of Re-Treatment." *Arthritis and Rheumatism* 62(5): 1273–79.
- Vital, E M, S Dass, et al. 2011. "B Cell Biomarkers of Rituximab Responses in Systemic Lupus Erythematosus ." *Arthritis and Rheumatism* 63(10): 3038–47.
- Vital, E M, A C Rawstron, et al. 2011. "Reduced-Dose Rituximab in Rheumatoid Arthritis: Efficacy Depends on Degree of B Cell Depletion." *Arthritis and Rheumatism* 63(3): 603–8.
- Vossenkamper, A, P M Lutalo, and J Spencer. 2012. "Translational Mini-Review Series on B Cell Subsets in Disease. Transitional B Cells in Systemic Lupus Erythematosus and Sjogren's Syndrome: Clinical Implications and Effects of B Cell-Targeted Therapies ." *Clinical and experimental immunology* 167(1): 7–14.
- Wardemann, H et al. 2003. "Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors." *Science (New York, N.Y.)* 301(5638): 1374–77.
- Wardemann, H, and M C Nussenzweig. 2007. "B-Cell Self-Tolerance in Humans." *Advances in Immunology* 95: 83–110.
- Warnatz, K et al. 2002. "Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B Cells in Common Variable Immunodeficiency (CVID) Patients with Autoimmune Cytopenia." *Immunobiology* 206(5): 502–13.
- Wehr, C et al. 2004. "A New CD21low B Cell Population in the Peripheral Blood of Patients with SLE." *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 113(2): 161–71.
- Weill, J C, S Weller, and C A Reynaud. 2009. "Human Marginal Zone B Cells ." *Annual Review of Immunology* 27: 267–85.
- Weller, S et al. 2004. "Human Blood IgM 'memory' B Cells Are Circulating Splenic Marginal Zone B Cells Harboring a Prediversified Immunoglobulin Repertoire ." *Blood* 104(12): 3647–54.
- . 2008. "Somatic Diversification in the Absence of Antigen-Driven Responses Is the Hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B Cell Repertoire in Infants ." *The Journal of experimental medicine* 205(6): 1331–42.
- Westers, T M et al. 2012. "Standardization of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: A Report from an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group ." *Leukemia* 26(7): 1730–41.
- Weston-Bell, N et al. 2009. "Defining Origins of Malignant B Cells: A New Circulating Normal Human IgM(+)D(+) B-Cell Subset Lacking CD27

- Expression and Displaying Somatic Mutated IGHV Genes as a Relevant Memory Population ." *Leukemia* 23(11): 2075–80.
- Wilson, K et al. 2010. "Flow Minimal Residual Disease Monitoring of Candidate Leukemic Stem Cells Defined by the Immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ in B-Lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." *Haematologica* 95(4): 679–83.
- Wirhth, S, and A Lanzavecchia. 2005. "ABCB1 Transporter Discriminates Human Resting Naive B Cells from Cycling Transitional and Memory B Cells ." *European journal of immunology* 35(12): 3433–41.
- Wu, Y C, D Kipling, and D K Dunn-Walters. 2011. "The Relationship between CD27 Negative and Positive B Cell Populations in Human Peripheral Blood ." *Frontiers in immunology* 2: 81.
- Yazdani, R et al. 2017. "Comparison of Various Classifications for Patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID) Using Measurement of B-Cell Subsets." *Allergologia et Immunopathologia* 45(2): 183–92.
- Yoshida, T et al. 2010. "Memory B and Memory Plasma Cells ." *Immunological reviews* 237(1): 117–39.
- Yuan, C M, and M Stetler-Stevenson. 2011. "Role of Flow Cytometry of Peripheral Blood and Bone Marrow Aspirates in Early Myeloma." *Seminars in hematology* 48(1): 32–38.
- Zou, Y R, and B Diamond. 2013. "Fate Determination of Mature Autoreactive B Cells ." *Advances in Immunology* 118: 1–36.

Abreviaturas

7-AAD	7-amino-actinomicina D
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
AMG	Amígdala
ANG	Linfocitos B anérgicos
APC	Aloficocianina
APC-H7	Aloficocianina análogo de cianina 7
AR	Artritis Reumatoide
BCR	Receptor de célula B, del inglés <i>B-cell receptor</i>
BV	<i>Brilliant violet</i>
BZ	Bazo
CG	Centro germinal
CP	Células plasmáticas CD138 ⁺
CV	Coefficiente de variación
DAS	Índice combinado de actividad de enfermedad, del inglés <i>Disease Activity Score</i>
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico bicatenario, del inglés <i>double stranded deoxyribonucleic acid</i>
EMR	Enfermedad mínima residual
FITC	Fluorescein-isotiocianato
G	Serie granulocito neutrófilo
GL	Ganglio
ICSP	Índice de contaminación con sangre periférica
Ig	inmunoglobulina
INM	Linfocitos B Inmaduras
LB	Linfocitos B
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LNH	Linfoma no Hodgkin
LTCD4+	Linfocitos T CD4 ⁺
MGUS	Ganmapatía monoclonal de significado incierto, del inglés <i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>

mill	millones
MM	Mieloma múltiple
M-NS CD27⁻	Linfocitos B memoria CD27- sin cambio de isotipo
M-NS CD27⁺	Linfocitos B memoria sin cambio de isotipo
MO	Médula ósea
MS CD27-	Linfocitos B memoria con cambio de isotipo sin expresión de CD27
MS CD27+	Linfocitos B memoria con cambio de isotipo
NS	No significativo
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7
PerCP-Cy5.5	Proteína peridinin clorofila-cianina 5
PL	Plasmablastos y células plasmáticas
PMT	Fotomultiplicador, del inglés <i>Photomultiplier</i>
PREC	Linfocitos B Precursoras
PV	Pénfigo vulgar
Rx	Rituximab
SEH	Sin enfermedad hematológica
SLP-B	Síndrome linfoproliferativo B
SMD	Síndrome mielodisplásico
SP	Sangre periférica
T	Linfocitos B Transicionales
TNF	Factor de necrosis tumoral, del inglés <i>Tumor necrosis factor</i>
VIRG	Linfocitos B vírgenes

Anexo

Delgado, J.A., et al. A simple flow-cytometry method to evaluate peripheral blood contamination of bone marrow aspirates. [Journal of Immunological Methods](#), 2017, 442:54-58. doi: 10.1016/j.jim.2016.12.006.