

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN MÉTODO *IN VITRO* RÁPIDO Y SIMPLE  
PARA LA ELUCIÓN DE ANTI-CD20 CON UNA SOLUCIÓN DE  
ÁCIDO-GLICINA-EDTA PARA LA  
INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LINFOCITOS B  
SENSIBILIZADOS CON RITUXIMAB**

Por:

**Q.F.B. ELI DE JESÚS FUENTES CHÁVEZ**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA**

**AGOSTO 2018**

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO *IN VITRO* RÁPIDO Y SIMPLE PARA LA  
ELUCIÓN DE ANTI-CD20 CON UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO-GLICINA-EDTA  
PARA LA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LINFOCITOS B  
SENSIBILIZADOS CON RITUXIMAB”**

Aprobación de Tesis:



---

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez  
Director de Tesis




---

Dr. Luis Javier Marfil Rivera  
Miembro de la comisión



---

Dr. David Gómez Almaguer  
Miembro de la comisión

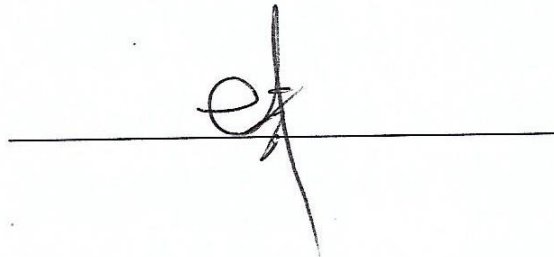


---

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO *IN VITRO* RÁPIDO Y SIMPLE PARA LA  
ELUCIÓN DE ANTI-CD20 CON UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO-GLICINA-EDTA  
PARA LA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LINFOCITOS B  
SENSIBILIZADOS CON RITUXIMAB”**

Presentado por: Q.F.B. Eli de Jesús Fuentes Chávez

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'E' and 'J' followed by a horizontal line and a vertical stroke extending downwards.

Este trabajo se realizó en el Servicio de Hematología del departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. med. José Carlos Jaime Pérez

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'J' and 'P' with a horizontal line and a vertical stroke extending downwards.

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez  
Director de Tesis

## **DEDICATORIA**

A mis padres Francisca y Anibal.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por mi familia extraordinaria y por permitirme alcanzar mis metas.

A mis padres Francisca y Anibal por ser mi guía y ejemplo durante mi vida, sin su apoyo y amor incondicional esto no hubiera sido posible, gracias por creer siempre en mí.

A mi hermana Adriana por siempre estar ahí cuando lo requería en las malas y en las peores, gracias por nunca desampararme.

Agradezco a mi Director de tesis el Dr. med José Carlos Jaime Pérez por ser un excelente guía en este proyecto.

De igual manera agradezco el apoyo del Dr. David Gómez Almaguer, al Dr. Luis Javier Marfil Rivera y a todo el equipo de Químicos, Médicos y personal administrativo del Servicio de Hematología por brindarnos su confianza, experiencia y conocimiento.

A mis amigos y esas personas mágicas que de forma incondicional están ahí para los malos y los buenos momentos, fueron una pieza clave durante este periodo, muy en especial a Maribel, Cristina y Alejandro

# TABLA DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Inmunofenotipificación por citometría de flujo.....	1
1.2 Cluster of differentiation CD20 (B1) .....	4
1.3 Rituximab .....	5
1.4 Reacción Antígeno-Anticuerpo .....	6
1.5 “Regulación negativa vs. Antígenos enmascarados” en el seguimiento de neoplasias hematológicas .....	10
1.5.1 Regulación negativa del CD20 .....	12
1.5.2 Enmascaramiento del CD20 con Rituximab ...	14
1.6 Elución .....	15
1.6.1 Elución mediante cambios en el pH con una solución Ácido-Glicina-EDTA.....	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivo general .....	23

4.2 Objetivos particulares .....	23
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
5.1 Sujetos incluidos en el estudio .....	24
5.2 Criterios de inclusión .....	25
5.3 Criterios de exclusión .....	25
5.4 Materiales y reactivos .....	25
5.5 Equipos .....	26
5.6 Descripción general de la metodología .....	27
5.7 Métodos .....	29
5.7.1 Separación de células mononucleares (CMN) mediante gradiente de densidad .....	29
5.7.2 Sensibilización completa de linfocitos B sanos y neoplásicos con Rituximab .....	30
5.7.3 Curva de saturación .....	30
5.7.4 Marcación de superficie .....	31
5.7.5 Adquisición de muestras e interpretación de gráficos de puntos .....	32
5.7.6 Elución con la solución Ácido-Glicina-EDTA..	32

5.8 Formulas y cálculos utilizados .....	33
5.9 Análisis estadístico .....	34
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
6.1 Resultados fase I .....	36
6.1.1 Comparación de medias de IMF de los linfocitos B por grupo .....	40
6.2 Resultados fase II .....	40
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>8. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>57</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Distribución del número moléculas CD20 por célula .....	5
II. Propiedades biológicas de las inmunoglobulinas humanas .....	7
III. Enlaces electrostáticos formados por el complejo antígeno- anticuerpo .....	9
IV. Mecanismos de ausencia a la terapia con anticuerpos .....	12
V. Mecanismos de resistencia al tratamiento con Rituximab .....	13
VI. Métodos de elución .....	17
VII. Concentraciones celulares en el grupo de sujetos sanos .....	36
VIII. Concentraciones celulares en el grupo de pacientes con neoplasia CD20+ .....	36
IX. Comparación entre las IMF de los linfocitos B entre grupos .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructura del CD20 .....	4
2. Secuencia del protocolo de elución en superficie de linfocitos B..	20
3. IMF de CD20 por grupo .....	37
4. IMF de CD19 por grupo .....	38
5. IMF de CD22 por grupo .....	39
6. Curva de saturación Paciente 1 LLC-B .....	41
7. Paciente 1 LLC-B porcentaje de CD20 bloqueado .....	42
8. Curva de saturación Paciente 2 LLC-B .....	43
9. Paciente 2 LLC-B porcentaje de CD20 bloqueado .....	44
10. Curva de saturación Paciente 3 Leucemia de células pilosas ..	45
11. Paciente 3 Leucemia de células pilosas porcentaje de CD20 bloqueado .....	46
12. Curva de saturación Paciente 4 LLC-B .....	47
13. Paciente 4 LLC-B porcentaje de CD20 bloqueado .....	48
14. Curva de saturación Paciente 5 Linfoma folicular .....	49
15. Paciente 5 Linfoma folicular porcentaje de CD20 bloqueado ...	50

16. Representación secuencial de cada una de las fases del  
protocolo (basal, bloqueo, elución) .....52

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>CDRs</b>	Regiones determinantes de complementariedad
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina M
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgD</b>	Inmunoglobulina D
<b>K<sub>1</sub></b>	Constante de asociación
<b>K<sub>2</sub></b>	Constante de disociación
<b>K</b>	Constante de equilibrio
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>EDTA</b>	Ácido etilenaminotetraacético
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>TRIS-NaCl</b>	(Hidroximetil)-aminometano sódico

<b>Er<sup>a</sup></b>	Antígeno antitético eritrocitario Er <sup>a</sup>
<b>Bg</b>	Antígenos HLA de clase I expresados en eritrocitos maduros
<b>LB</b>	Linfocitos B
<b>IMF</b>	Intensidad Media de Fluorescencia
<b>PBS-BSA</b>	Buffer salino de fosfatos con albumina de suero bovino
<b>LLC-B</b>	Leucemia linfocítica crónica de células B
<b>LCP</b>	Leucemia de células pilosas
<b>LF</b>	Linfoma folicular
<b>CMN</b>	Células mononucleares
<b>EMR</b>	Enfermedad mínima residual

## LISTA DE SIMBOLOS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>ml</b>	Mililitro
<b>μl</b>	Microlitro
<b>dl</b>	Decilitro
<b>min</b>	Minuto
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>mg</b>	Miligramos
<b>KDa</b>	Kilodalton

# RESUMEN

Q.F.B. Eli de Jesús Fuentes Chávez  
Fecha de graduación: Agosto 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del estudio:

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO *IN VITRO* RÁPIDO Y SIMPLE PARA LA ELUCIÓN DE ANTI-CD20 CON UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO-GLICINA-EDTA PARA LA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LINFOCITOS B SENSIBILIZADOS CON RITUXIMAB”.**

Número de páginas: 61

Candidato para el Grado de Maestría en Laboratorio de Hematología  
Área de estudio: Hematología clínica

“Propósito y método del estudio”: El seguimiento de pacientes con neoplasias hematológicas se basa en estudios de enfermedad mínima residual en protocolos de citometría de flujo (CF), la problemática surge cuando estos pacientes se les administra terapias monoclonales, estos fármacos utilizan al igual que los protocolos de marcación en CF, los antígenos de diferenciación hematopoyéticos, las terapias pueden enmascarar el antígeno blanco y en consecuencia la ausencia de marcaje por anticuerpos fluorescentes, puede ser interpretado como un comportamiento aberrante lo que se puede asociar a que la célula neoplásica cursa por un proceso de regulación negativa. En la actualidad no hay métodos estandarizados que permitan diferenciar entre un proceso de regulación negativa y un enmascaramiento, por lo que el objetivo de estudio es aplicar por primera vez en superficie leucocitaria un método de elución con una solución Ácido-Glicina-EDTA que permita disociar la terapia monoclonal y después identificar el blanco mediante protocolos de CF, se emplearon muestras de Linfocitos B de 10 sujetos sanos y 5 pacientes con neoplasia hematológica CD20+, para evaluar la efectividad del método y su efectos colaterales en las células, evaluando estadísticamente el desempeño.

“Contribuciones y Conclusiones”: En el presente trabajo se muestra por primera vez como el protocolo es efectivo en la membrana leucocitaria para el estudio de antígenos sensibilizados con una terapia monoclonal, evidenciando que la las terapias monoclonales interfieren en la detección de antígenos “in vitro” y que manipulación técnica ni el cambio en el pH con la solución Acido-Glicina-EDTA altera significativamente la expresión ni la inmunoreactividad de antígenos de importancia para la inmunofenotipificación de los linfocitos B normales y neoplásicos, el protocolo de elución nos permitirá diferenciar entre un fenómeno de enmascaramiento en el caso de obtener señal del blanco después de aplicarlo o confirmar un fenómeno de regulación negativa en el caso de no obtener señal del blanco .

---

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez  
Director de Tesis

# CAPITULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Inmunofenotipificación por citometría de flujo.

La citometría de flujo apareció en los laboratorios clínicos en la década de 1980, en el despertar epidemiológico del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), inicialmente aplicada para ensayos en linfocitos CD4+, y posterior a esto la técnica fue pronto aplicada al estudio de neoplasias linfoides y mieloides (1).

Esta técnica es un ensayo multiparamétrico, el cual se basa en hacer pasar una suspensión de partículas alineadas de forma individual por un haz de luz focalizado y de la luz dispersa se interpretan propiedades morfológicas y estructurales de la célula mientras que de la fluorescencia emitida deriva la presencia y cantidad de un componente celular (2), en el contexto de las células hematopoyéticas se logra interpretar características como el tamaño, granularidad y antígenos de diferenciación hematopoyéticos.

Los antígenos de diferenciación hematopoyéticos (*Cluster of differentiation antigens*), son moléculas en su mayoría de origen proteico, que cumplen un rol en los diferentes procesos bioquímicos celulares y que conforme las células se diferencian estos compuestos disminuyen o incrementan su concentración. Estas moléculas han logrado ser identificados gracias al uso de anticuerpos monoclonales, los cuales además de la identificación de la molécula, permiten evidenciar sus propiedades bioquímicas y la distribución celular (3).



Estas estructuras se clasifican en diferentes grupos dependiendo su distribución en la membrana celular: proteínas transmembranales de tipo I las cuales tienen el grupo carboxilo terminal (COOH-) intracitoplasmático y su grupo amino terminal (NH<sub>3</sub>-) extracelular, las proteínas transmembranales de tipo II a la inversa que las del tipo I esta tienen el grupo amino terminal intracitoplasmático y el carboxilo terminal extracelular, las proteínas transmembranales de tipo III atraviesan la membrana en más de una ocasión y ambos extremos amino y carboxilo terminales están ubicados dentro del citoplasma, las proteínas transmembranales de tipo IV que además de atravesar la membrana en más de una ocasión forman canales de agua transmembranales y las de tipo V que se unen a una estructura lipídica para anclarse a la membrana plasmática.

La caracterización de la presencia o ausencia de estos antígenos específicos en la membrana de las células hematopoyéticas se conoce como inmunofenotipo y su principal utilidad radica en la clasificación de neoplasias hematológicas.

En las últimas dos décadas la inmunofenotipificación por citometría de flujo ha permitido categorizar el fenotipo de poblaciones celulares tumorales, permitiendo identificarlas aún en coexistencia residual con subpoblaciones de leucocitos sanos, lo que convierte a este método en un pilar fundamental para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de pacientes con leucemia y linfoma (4).

La interpretación inmunofenotípica de las células individuales en suspensión permite la identificación de los diferentes linajes y su estadio madurativo, también permite la detección de antígenos anormales o la expresión antigénica distinta a

su contraparte sana y puede brindarnos datos sobre pronóstico e identificación de potenciales blancos para una terapia dirigida (5).

Los diversos paneles que se pueden emplear para inmunofenotipificación de neoplasias malignas incluyen anticuerpos para la identificación de antígenos específicos de linaje, cuya combinación permite establecer patrones de maduración con los cuales se logra definir el arresto en la etapa madurativa de la población neoplásica y no solo eso sino también la expresión antigénica aberrante.

La ventaja clara de este método es la capacidad de discriminar rápidamente, por un análisis multiparamétrico y cuantitativo la expresión de los antígenos expresados en cada célula y el tamaño de la población cuantificada (6).

Sin embargo, es importante definir el contraste entre los protocolos de inmunofenotipificación para diagnóstico y los ensayos de enfermedad mínima residual, en estos últimos se requiere que el método incremente su sensibilidad y especificidad, para detectar poblaciones aberrantes inmersas en células normales y esto se logra incrementando el número de células que se adquieren y la combinación de marcadores específicos, diversos trabajos de investigación muestran protocolos estandarizados dependiendo el tipo de neoplasia y la mejor estrategia para evaluar mínima residual (7, 8, 9).

## 1.2 Cluster of differentiation CD20 (B1).

El receptor CD20 es una fosfoproteína no glicosilada de 33-37 KDa (8), es expresada en los linfocitos B, aproximadamente en la etapa pre-B justo después de la síntesis de la cadena pesada  $\mu$ , y que permanece hasta la diferenciación a célula plasmática (9). Esta proteína atraviesa la membrana en 4 puntos, dejando

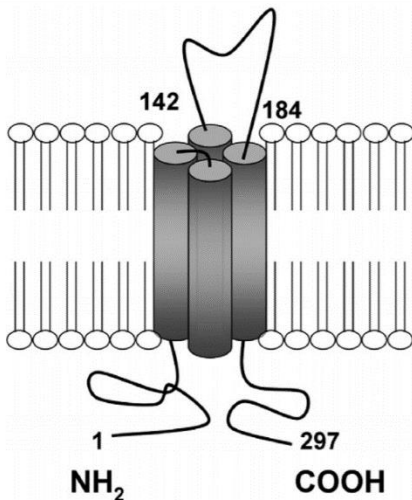


Figura 1. Estructura del CD20

2 secciones en la zona extracelular que sirven como ligandos y la región intracelular contiene sitios de fosforilación de tirosin cinasa, con 2 regiones terminales, una de ellas con un grupo amino y otra con un grupo carboxilo, además de un pequeño lazo entre el tercer y cuarto dominio intracelular (ver Figura 1) (10, 12, 13).

El CD20+ está involucrado en la regulación y activación del ciclo celular, proliferación y diferenciación de las células B (10, 11). Opera principalmente como canal de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), facilitando la entrada de este del medio extracelular (12, 15, 16).

La expresión de este receptor es más tardía que otros marcadores de las células B, durante el desarrollo normal de esta línea, la densidad de la molécula en la membrana incrementa conforme se diferencia la célula, es decir los precursores expresan menor densidad que las células maduras B (13). La molécula es expresada aproximadamente entre 10000-20000 copias por célula y esta expresión es exclusiva del linaje B (11,17).

En estado patológico se ha demostrado que algunos antígenos son expresados en diferente densidad, si se compara con su contraparte sana. Lo mismo ocurre en el caso del CD20+, en diferentes trastornos de las células B, la densidad del antígeno es distinta (ver Tabla I) (10,16).

Todo este conjunto de características: *exclusividad de linaje, alta expresión, ligandos extracelulares, ausencia en el plasma, que no se desprende de la superficie celular y no es internalizado después de la unión con el anticuerpo* hace que sea un blanco ideal para una terapia dirigida (10, 11).

**Tabla I**

<b>Distribución del número de moléculas de CD20 por célula</b>	
<b>Presentación clínica</b>	<b>Media/rango de CD20</b>
Linfocitos B sangre periférica individuo sano	10,819 (1,315-18,194)
Linfocitos B médula ósea individuo sano	19,193 (12,642-27,707)
Leucemia linfocítica crónica B	4,067 (563-46,395)
Linfoma folicular	22,240 (3,689-39,643)
Linfoma de células del manto	29,770 (2,785-97,727)
Linfoma esplénico de linfocitos pilosos	23,481 (1,824-56,729)
Linfoma de células grandes B	23,650 (2,346-54,774)
Leucemia de células pilosas	31,563 (1607-72,540)

Tabla adaptada de Huh, Y. O., Keating, M. J., Saffer, H. L., Jilani, I., Lerner, S., & Albitar, M. (2001). Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*, 116(3), 437-443

### 1.3 Rituximab.

Rituximab fue desarrollado en 1980 y fue el primer anticuerpo monoclonal que reconocía al CD20, pero no fue hasta 1997 que fue aprobado por la FDA (MabThera, Hoffmann La-Roche, Switzerland), especialmente para el tratamiento de pacientes con Linfoma No Hodgking CD20+ refractario. Este anticuerpo monoclonal terapéutico tiene alta afinidad a la molécula, y posee naturaleza quimérica, es decir la región de cadena pesada (IgG<sub>1</sub>) de origen humano y las

cadenas ligeras kappa de origen murino. El peso molecular del Rituximab es de 144,544 Daltons, está constituido por 1328 aminoácidos <sup>(12)</sup>, y tiene una sobrevivencia cercana a los 22 días una vez administrado <sup>(15)</sup>. Los mecanismos de acción ejercidos Rituximab se basan en citotoxicidad dependiente de anticuerpos, citotoxicidad mediada por células e inducción de señales de apoptosis <sup>(16)</sup>.

El uso de esta terapia monoclonal en sinergia con quimioterapia mejora las tasas de respuesta en linfomas no Hodgkin de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, leucemias del manto, macroglobulinemia de Waldenström y linfomas de la zona marginal <sup>(17)</sup> y se utiliza cada vez más para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Las reacciones por administración intravenosa en los pacientes se limitan a fiebre, escalofríos, dolor faríngeo, urticaria, hipertensión y con poca frecuencia reacciones mucocutáneas y dérmicas graves <sup>(18)</sup>.

#### **1.4 Reacción Antígeno-Anticuerpo.**

La reacción antígeno-anticuerpo es una interacción fisicoquímica que está ligada directamente a la composición química de los reactantes, es decir la complementariedad conformacional de los compuestos y su carga.

En el caso de los anticuerpos, los sitios de unión de las moléculas están formados por seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs), 3 en la cadena ligera y 3 en la pesada, estas regiones son las que hacen contacto más estrecho con los determinantes antigénicos de un antígeno, y por tal motivo son

nombrados sitios hipervariables. Estos sitios se componen de polímeros de aminoácidos organizados con las características estereoquímicas y electrónicas complementarias al antígeno para el cual fue sintetizado (ver Tabla II) (19).

**Tabla II**

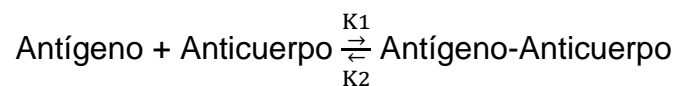
<b>Propiedades biológicas de las inmunoglobulinas humanas</b>					
Clase de inmunoglobulina	<b>IgM</b>	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>IgE</b>	<b>IgD</b>
Cadena pesada	mu (μ)	gamma (γ)	alfa (α)	épsilon (ε)	delta (δ)
Cadena ligera	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ
Polimerización	P	M	M y D	M	M
Peso molecular (KD)	900	140-150	160-320	200	150-160
Componente secretor	No	No	Sí	No	No
Numero de oxidación	5	2	2-4	2	2
Concentración en suero (mg/dl)	45-250	620-1600	50-500	0.002-0.2	0.3-5
Activación de complemento	Sí	Sí	No	No	No
Vida media (días)	9-11	25-35	6-8	2	2-3

*P= Pentámero, M= Monómero, D= Dímero*

*Adaptado de Rojas-Espinosa Ó. Inmunología (de memoria). 3ª Edición. Médica Panamericana; 2006. Pag 201.*

En el caso de los antígenos estos reúnen características que determinan su inmunogenicidad, estas van desde su estructura, tamaño molecular, carga eléctrica, el estado físico y su conformación estérica y optica (20).

La interacción antígeno-anticuerpo es considerada una reacción bioquímica reversible que se rige por la ley de acción de masas y se explica a continuación:



Donde K1 representa la constante de asociación y K2 la constante de disociación, y cuya constante de equilibrio (K) se interpreta de la siguiente forma:

$$\frac{[\text{Antígeno} - \text{Anticuerpo}]}{[\text{Antígeno}][\text{Anticuerpo}]} = \frac{K1}{K2} = K$$

La concentración del complejo entre la concentración de reactantes es igual a la constante de equilibrio de reacción, y cada interacción Ag-Ac genera energía libre de reacción la cual está en función de la entalpía y entropía propia de las moléculas que intervienen (19).

Estas interacciones están basadas en enlaces electrostáticos, es decir enlaces en donde intervienen las cargas eléctricas de los reactantes, los diversos enlaces que se pueden generar son mostrados en la Tabla III.

Además de la interacción fisicoquímica entre las moléculas, existen factores del medio que tienen efecto directo sobre la constante de equilibrio permitiendo su desplazamiento hacia productos o hacia reactantes (25, 26), los más relevantes se explican a continuación:

*Temperatura:* los cambios en la temperatura generan cambios conformacionales en las proteínas, y dependiendo su rango estos cambios pueden favorecer o entorpecer la complementariedad estructural entre las moléculas.


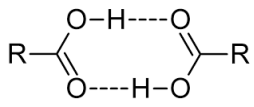
*pH:* los cambios en el pH generan que las proteínas modifiquen su carga electrostática y de esta forma la capacidad de unión con otras moléculas.

*Fuerza iónica:* la fuerza iónica se refiere a la intensidad del campo eléctrico en una solución, según el rango en el medio de reacción se puede favorecer la interacción entre las moléculas, es decir que un incremento

en la fuerza iónica favorece la neutralización de las cargas de los reactantes y por lo tanto disminuye la formación de los complejos y viceversa, la disminución en la fuerza iónica permite la interacción entre las cargas de los reactantes.

**Tabla III**

**Enlaces electrostáticos formados por el complejo antígeno-anticuerpo**

Reacción Ag-Ac	Enlace
$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^- \leftrightarrow \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	<b>Iónico</b> (Cargas opuestas)
	<b>Fuerzas de van der Waals</b> (Fluctuaciones en las nubes de electrones alrededor de las moléculas)
$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}^- \cdots \text{H}^+ \\ \text{H}^+ \cdots \text{O}^- -\text{CH}_2-\text{CH}_2- \end{array}$	<b>Dipolo-dipolo</b> (Enlace entre el extremo positivo de una molécula polar y el negativo de otra)
	<b>Puentes de hidrogeno</b> (Iones de hidrogeno compartidos por distintos grupos con cargas opuestas)
$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}^+ + \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \uparrow \downarrow \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \\ \text{R} \end{array}$	<b>Covalentes reversibles</b> (Bases de Schiff)

*Adaptado de Rojas-Espinosa Ó. Inmunología (de memoria). 3ª Edición. Medica Panamericana; 2006. Pag 213.*

**Concentración de los reactantes:** la velocidad de formación del complejo anágeno y anticuerpo está directamente relacionado al número de moléculas de anticuerpo en el medio y el número de sitios antigénicos disponibles.

Estas características fisicoquímicas de las moléculas (antígeno y anticuerpo) como del medio donde reaccionan, se engloban en las propiedades generales de la reacción (especificidad, avidéz y afinidad) y la forma en la que se pueden



presentar cuando se estudian en condiciones controladas desde el laboratorio. Estas propiedades generales de reacción (24, 27, 28) se describen a continuación:

*Especificidad:* Es la capacidad que posee el anticuerpo de diferenciar entre unos antígenos estructuralmente similares a su blanco.

*Afinidad:* es la cantidad de energía que es contenida por cada uno de los enlaces entre el anticuerpo y el antígeno.

*Avidez:* Indica el grado de interacción entre el antígeno y el anticuerpo.

En el laboratorio en condiciones controladas estas reacciones pueden ser evidenciadas mediante diferentes técnicas como precipitación, aglutinación y una gran variedad de inmunoensayos (enzimáticos, fluorescentes, radioactivos, quimioluminiscentes).

### **1.5 “Regulación negativa vs. Antígenos enmascarados” en el seguimiento de las neoplasias hematológicas.**

Sabemos que el cáncer es producido por la pérdida de la homeóstasis celular donde se involucran alteraciones genéticas que permiten que las células adquieran características que comprometen la regulación de sus funciones. En el caso de las neoplasias hematológicas, estas se pueden presentar en forma de tumor sólido o diseminado (leucemia). Su clasificación se basa en estudios morfológicos, inmunofenotipificación, caracterización genética y clínica (19, 21), en nuestro país la incidencia de estas enfermedades ha sido recientemente reportada (22, 23), destacando que leucemias agudas, crónicas y linfomas son las

que encabezan la lista de prevalencia en una gama de enfermedades hematológicas.

Diversos estudios que abordan la forma en la que las células cancerígenas evaden señales de regulación o los mecanismos por los cuales se vuelven resistentes a tratamiento (23, 24). La desregulación de los mecanismos homeostáticos que favorecen la proliferación de clonas malignas incluyen la pérdida de la vigilancia inmunológica en donde el sistema inmunológico innato y adaptativo toleran o no detectan el tumor en desarrollo y no pueden contenerlo, el déficit de señalización y la ausencia en la interacción de receptores es uno de los factores desencadenantes. Aunado a la pérdida de vigilancia existen casos donde el sistema inmune responde limitadamente, es decir mantiene a las células tumorales residuales en un estado funcional de latencia, las cuales pueden rescindir durante periodos largos de tiempo y existen otras condiciones en donde las células cancerígenas son capaces de eludir la acción del sistema inmune y de igual manera tratamientos farmacológicos, lo anterior mediante cambios estructurales, metabólicos y de señalización que le permiten seguir proliferando.

Enfocándonos en neoplasias multi-drogo resistente, específicamente a tratamientos como las terapias monoclonales, hechos como la expresión heterogénea del blanco antigénico, las propiedades farmacológicas de los anticuerpos usados y el microambiente intratumoral son las características a resaltar en las rutas de escape de las células tumorales (25). Los principales mecanismos son descritos en la Tabla IV.

**Tabla IV**

<b>Mecanismos de ausencia de respuesta a la terapia con anticuerpos</b>	
<b>Propiedad terapéutica del anticuerpo</b>	<b>Razones de ausencia de respuesta terapéutica</b>
Blanco antigénico	Heterogeneidad o mutación (inicial o adquirida), regulación negativa del antígeno
Farmacocinética	Estabilidad, inmunogenicidad y vida media del anticuerpo
Disponibilidad y concentración tumoral	Tamaño y afinidad del anticuerpo
Disponibilidad el receptor	Baja concentración del anticuerpo, saturación del receptor, bloqueo inefectivo.
Ruta de señalización inhibida	La ruta de señalización no es relevante para el crecimiento tumoral, presencia inicial o desarrollo de rutas de señalización compensatorias
Función efectora inmune	Isotipo del anticuerpo, polimorfismos de la región variable, inhibición por complemento
Inducción de la respuesta de células T	Supresión inmune (regulación de células T)
Dosis efectiva	Concentración inadecuada en el tumor, resistente a drogas

*Adaptado de Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Vol. 12, Nature Reviews Cancer. 2012. p. 278–87*

### **1.5.1 Regulación negativa del CD20**

El termino regulación negativa se refiere a la pérdida parcial o completa de la síntesis o expresión de una molécula, lo cual puede deberse a supresión en la activación de genes específicos, o de procesos celulares que alteran la disposición de estas moléculas en la célula.

Este fenómeno ha sido estudiado en diversas neoplasias y ha tomado relevancia debido a que las principales moléculas reguladas son blancos terapéuticos importantes para el tratamiento de los pacientes. En cuanto al receptor CD20 este ha representado un problema considerable debido a que es el objetivo terapéutico del Rituximab, y como ya mencionamos con anterioridad (ver capítulo

I, sección 1.3) tiene trascendencia en el seguimiento terapéutico y pronóstico del paciente (26).

Los mecanismos reportados por los cuales las células neoplásicas son resistentes a la terapia con Rituximab se muestran a continuación, son divididos en dos, el primero va de acuerdo con los mecanismos que evitan la unión Rituximab-CD20 y aquellos que evitan que la célula sea eliminada después de esta unión (ver Tabla V).

**Tabla V**

<b>Mecanismos de resistencia al tratamiento con Rituximab</b>	
<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>
<b>Unión al CD20</b>	Disminución/ausencia en la expresión de CD20
	Incremento en la concentración de CD20 o incremento en la carga tumoral
	Incremento en el metabolismo del anticuerpo
	Pobre penetración al tumor
<b>Posterior a la unión al CD20</b>	
<i>Señalización de células B</i>	Agrupamiento en membrana Alteraciones en la tirosin cinasa
<i>Apoptosis directa</i>	Incremento de bcl-2
<i>Activación de complemento</i>	Inhibidores de complemento
<i>Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos</i>	Polimorfismo de cadenas ligeras Disminución de células efectoras Inhibición de perforinas/granzimas

Adaptado de Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): Mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7359-68.

Estos mecanismos están ligados directamente a la supresión en la expresión de genes (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33), a la respuesta ineficiente del sistema inmune innato y adaptativo (34, 35, 36), o a procesos bioquímicos y celulares que repercuten en la respuesta biológica, aun y cuando la unión CD20-Rituximab se ha llevado a cabo, como lo son mecanismos de internalización del CD20, interferencia en la

accesibilidad de la estructura proteica mediado por factores de inhibición o el rápido metabolismo del anticuerpo.

Lo trascendente de estos mecanismos es que ya son considerados como una problemática grave debido a que se ha demostrado que en algunas neoplasias los pacientes tienen una tasa de sobrevida baja (37).

### **1.5.2 Enmascaramiento del CD20 con Rituximab**

En la práctica actual el seguimiento en de pacientes con neoplasias hematológicas en nuestro país es mediante protocolos de enfermedad mínima residual por citometría de flujo esto es porque representa la alternativa más viable debido a su sensibilidad, accesibilidad y costo. La problemática que surge es que en pacientes que tanto los protocolos de inmunofenotipificación como las terapias monoclonales utilizan los antígenos de diferenciación hematopoyéticos, los primeros con el fin de clasificar una neoplasia y los segundos con el fin de actuar como una terapia dirigida, con los protocolos de inmunofenotipificación partimos para establecer diagnóstico y una vez definido la terapia con monoclonales suma al tratamiento, el fenómeno que ocurre es que la terapia monoclonal (Rituximab) bloquea el antígeno , en este caso el CD20, evitando que el anticuerpo fluorescente para estudios de laboratorio se una a su molécula blanco (37, 38), lo que se refleja en problemas de interpretación y asignación correcta y precisa del inmunofenotipo de la neoplasia.

Este fenómeno de enmascaramiento ha sido recientemente descrito y abordado por diferentes publicaciones en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple, a los cuales se les daba seguimiento de enfermedad mínima residual por citometría de flujo y habían recibido Daratumumab (anti-CD38) durante su tratamiento, en ellos se observó que la marcación del antígeno CD38 con el anticuerpo fluorescente correspondiente no era eficiente (39).

Este antecedente sugiere que este fenómeno de interferencia del anticuerpo terapéutico administrado in vivo puede interferir en el estudio por citometría de flujo de la presencia del antígeno correspondiente en las células neoplásicas de cualquier paciente que recibe terapia monoclonal y esta ausencia de marcaje puede llegar a ser mal asociada a un proceso de regulación negativa en la clona maligna, simulando a una ruta de escape.

Las alternativas para solucionar la problemática descrita incluyen incrementar el número de anticuerpos específicos de un linaje celular para identificación de la población, probar diferentes clonas dirigidas a un antígeno o la adquisición de anticuerpos multiepitopo (37, 38, 39), cuya finalidad es marcar otros determinantes antigénicos de la molécula bloqueada, sin embargo, esto sería complicado, poco práctico, no todas las metodologías están validadas para un laboratorio clínico de rutina y representaría un incremento considerable en los costos de la prueba.

## **1.6 Elución.**

El termino elución en química orgánica se refiere a la extracción de un material inmerso (usualmente referido a un solvente orgánico) en otro (21). Enfocándose a

la reacción antígeno anticuerpo la elución es el término que se le da al método que permite la disociación del complejo antígeno-anticuerpo. Estos métodos deben tener las características básicas de no ser tan vigorosos para que los reactantes (antígeno y anticuerpo) preserven sus características fisicoquímicas una vez separados, esto con el fin del posterior estudio de estas moléculas (40). Todos los estudios que abordan métodos de elución son enfocados en los laboratorios de referencia del área de inmunohematología, para el estudio de antígenos y anticuerpos involucrados en reacciones hemolíticas, es decir aloanticuerpos o autoanticuerpos de naturaleza IgG clínicamente significativos y los antígenos presentes en los glóbulos rojos de los pacientes (21, 41, 42, 43).

Como ya hemos revisado anteriormente (ver Capítulo I, sección 1.4) la reacción antígeno anticuerpo está condicionada tanto a las características propias de las moléculas en reacción (antígeno y anticuerpo), como a la de las condiciones del medio donde se lleva a cabo, esta es una reacción reversible que está directamente ligada a la ley de acción de masas. Los métodos descritos en literatura para realizar la disociación del complejo antígeno-anticuerpo basan el fundamento del método en el desplazamiento de la constante de equilibrio de productos a reactantes, esto mediante cambios en las características fisicoquímicas del medio de reacción, considerando siempre que la manipulación del medio no altere las características inmunoreactivas de los reactantes o que si lo llegan a hacer sea a la molécula que no va a ser estudiada.

El primer método de elución fue descrito por Karl Landsteiner en 1902 y publicado hasta 1925, describiendo una técnica de disociación del complejo dependiente

de temperatura (56°C) (44), este hecho fue parteaguas para otros investigadores en el campo de la inmunohematología, donde se desarrollaron diferentes métodos para abordar este efecto. Los diferentes métodos de elución se muestran en la Tabla número VI.

**Tabla VI**  
**Métodos de elución**

<b>Investigador</b>	<b>Método</b>
Landsteiner y Miller (44)	Dependiente de calor (56°C)
Rubin (45)	Éter a 37°C
Rekvig y Hannestad (46), Bush (47)	Solución glicina-salina fría
Eicher y colaboradores (48)	Congelación (-20 a -70 °C) y rápida descongelación
Branch y colaboradores (49)	Cloroformo a 56°C
Massuet y colaboradores (50)	Cloroformo/ tricloroetileno a 37°C
Deisting y colaboradores (51)	D-limoneno a 56°C
Ellisor y colaboradores (52)	Diclorometano
Chan-Shu y Blair (53), Bueno y colaboradores (54)	Xileno a 56°C
Bird y Wingham (55), Jimerfield (56)	Sonicación
Meier y colaboradores (57)	Microondas
Kosanke, McDowell y Stocker (58)	Ácido-Glicina-EDTA

Adaptado de Judd WJ. Elution - Dissociation of antibody from red blood cells: Theoretical and practical considerations. *Transfus Med Rev.* 1999;13(4):297-310.

Las modificaciones al medio de reacción implican cambios termodinámicos, efectos que neutralizan o revierten a las fuerzas de atracción o intervienen en la distribución de la complementariedad estructural entre el antígeno y el anticuerpo (21).

En la práctica igual en los laboratorios de referencia se emplean los métodos basados en modificación de pH, esto mediante una solución de glicina acida, con o sin adición de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), las metodologías varían además de las soluciones empleadas, en la molécula que será objeto de estudio,



es decir cada método conservara inmunoreactividad del antígeno o del anticuerpo, pero no dé ambos. Las ventajas que presentan estos métodos frente a otros van desde la estabilidad de los reactivos, que no son cancerígenos, no tienen alto costo, su conservación no requiere condiciones ni instrumentación especiales y son metodologías rápidas y simples.

### **1.6.1 Elución mediante cambios en el pH con una solución Ácido-Glicina-EDTA**

La elución Ácido-Glicina-EDTA es una técnica aplicada en los laboratorios de inmunohematología que se emplea para la disociación del complejo antígeno-anticuerpo, con la particularidad de que esta validada para el estudio in-vitro de antígenos de la superficie eritrocitaria que están unidos a aloanticuerpos o autoanticuerpos de naturaleza IgG (clínicamente significativos) y dicha unión no permite la correcta fenotipificación del hematíe, es por eso que una vez realizada la elución el eluato resultante es descartado, conservando los eritrocitos para su estudio.

El método se fundamenta en la modificación del pH del medio, cuando las células son enfrentadas a la solución Ácido-Glicina-EDTA las células interactúan con un medio ácido (pH 3), este cambio drástico generara que las proteínas modifiquen su carga positivamente (es decir un estado catiónico), en este estado las moléculas pierden su capacidad de atracción electroestática y son separadas por poseer la misma carga (21, 58). Lo que vuelve al método sensible para el estudio de antígenos es la adición de EDTA, cuando solo se emplea una solución de

glicina acida (HCl 0.1M pH 1.5) la célula es lisada y estroma celular precipitado para después disociar el complejo antígeno-anticuerpo (y estudiar el anticuerpo), al adicionar EDTA a esta solución el pH se modifica a un valor de pH 3 generando un medio no tan hostil, isoosmolar y con esto se preservan las características morfológicas y estructurales del eritrocito <sup>(59)</sup>; pero es de importancia resaltar que no es un medio ideal para preservación, es un medio que facilita la disociación del complejo antígeno anticuerpo y preserva la integridad de la mayoría de los antígenos eritrocitarios pero en función al tiempo, es decir una prolongada estancia en el medio destruiría a las células y el eluato resultante estaría contaminado con restos celulares; el tiempo estándar en las metodologías es de 1 minuto, posterior a esto el medio debe neutralizarse con un buffer TRIS-NaCl [(hidroximetil)-aminometano sódico] 1 molar.

Este método tiene sus limitaciones para fenotipificación debido a que se ha comprobado que inactiva a los antígenos eritrocitarios del sistema Kell <sup>(60)</sup>, Er<sup>a</sup> <sup>(61)</sup>, y Bg <sup>(62)</sup>.

Dadas las características de la técnica, este método puede ser aplicado en la práctica actual de la citometría de flujo, esto con el fin de dilucidar entre un fenómeno de regulación negativa o un enmascaramiento antigénico con una terapia monoclonal.

El fin de este trabajo consiste en mostrar que el método puede ser exportado a la membrana leucocitaria permitiendo la disociación de terapias monoclonales unidas a blancos terapéuticos y no solo eso, sino que el método y la manipulación

técnica no afecten la inmunoreactividad o la expresión de otros antígenos de importancia clínica para inmunofenotipificación de leucocitos (ver Figura 2).

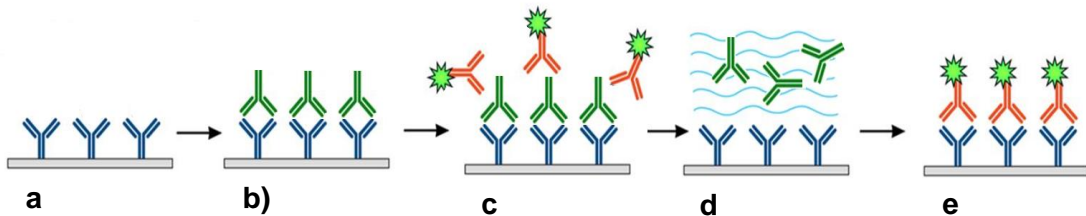


Figura 2. Secuencia del protocolo de elución en superficie de linfocitos B (LB). **a)** Representa el CD20 en la superficie del LB. **b)** Nos muestra el complejo Rituximab-CD20 sobre la superficie del LB. **c)** Representación del bloqueo del antígeno CD20 con Rituximab y el anticuerpo fluorescente anti-CD20 incapaz de unirse con su molécula blanco. **d)** Representación del protocolo de elución con una solución Ácido-Glicina-EDTA para la disociación del complejo Rituximab-CD20. **e)** Representación de la unión del antígeno fluorescente anti-CD20 con su blanco para la detección por citometría de flujo.

## **CAPITULO II**

### **2. JUSTIFICACIÓN**

La identificación del antígeno CD20 en los protocolos de citometría de flujo es necesaria para el diagnóstico definitivo de pacientes con malignidades de células B que reciben terapia monoclonal con Rituximab.

## **CAPITULO III**

### **3. HIPÓTESIS**

El anticuerpo terapéutico anti-CD20 interfiere en el protocolo de citometría de flujo para determinar la presencia del antígeno correspondiente y puede ser eluido mediante un cambio en el pH.

## CAPITULO IV

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Desarrollar un método *in vitro* para elución del Rituximab que permita estudiar la presencia del antígeno CD20 por citometría de flujo.

#### 4.2 Objetivos particulares

1. Establecer en qué grado el anticuerpo terapéutico anti-CD20 interfiere en el marcaje *in vitro* de dicho receptor en protocolos de inmunofenotipificación.
2. Comprobar que la elusión mediante cambios en el pH con una solución Ácido-Glicina-EDTA permite la disociación de este anticuerpo monoclonal de la superficie de los linfocitos B.
3. Comprobar que el método y el cambio de pH no alteran el nivel de expresión de otros antígenos para la correcta inmunofenotipificación de las células B, CD20+.

## CAPITULO V

### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue desarrollado en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina que pertenece a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Fue un estudio experimental y prospectivo donde evaluamos el efecto de enmascaramiento *in vitro* del Rituximab sobre el CD20+ y la capacidad del método de elución (Ácido-Glicina-EDTA) para disociarlo y permitir identificarlo mediante citometría de flujo.

#### 5.1 Sujetos incluidos en el estudio.

En este estudio se incluyeron a 15 sujetos, los cuales se separaron en dos grupos de estudio, el primero de ellos corresponderá al grupo de “fase I” el cual se conformó de 10 individuos sanos y el grupo de “fase II” con 5 pacientes de recién diagnóstico de una neoplasia hematológica CD20+, principalmente leucemia linfoblástica de células B y linfoma no Hodgkin que no hayan recibido terapia monoclonal con rituximab y que acudan al Servicio de Hematología del Hospital Universitario Dr. José E. González de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los datos del diagnóstico y tratamiento de los pacientes se obtuvieron del expediente clínico incluyendo la información de la determinación de CD20+ antes y después del protocolo de elusión, al igual que

los demás parámetros de laboratorio rutinarios pertinentes de la base de datos electrónica del laboratorio del Servicio de Hematología.

## **5.2 Criterios de inclusión**

- 1.- Diagnóstico de una neoplasia hematológica CD20+ confirmada por citometría de flujo
- 2.- Expresión homogénea del antígeno CD20+ (>50% de la población sea CD20+)
- 3.- No haber iniciado terapia biológica monoclonal con Rituximab
- 4.- Sujetos de cualquier edad y sexo
- 5.- Expediente clínico completo

## **5.3 Criterios de exclusión**

- 1.- Paciente con expediente clínico incompleto
- 2.- Pacientes en los que la población CD20+ no sea expresado homogéneamente (<50% de la población sea CD20+)

## **5.4 Materiales y Reactivos**

- HISTOPAQUE 1077 (SIGMA-ALDRICH)
- Anticuerpos marcados con fluorocromos:
  - CD20 (V450/L27/Becton Dickinson)
  - CD19 (PE-cy7/SJ25C1/Becton Dickinson)



- CD22 (APC//Becton Dickinson)
- CD45 (V500-C/2D1/Becton Dickinson)
- CD14 (APC-H7/MφP9/ Becton Dickinson)
- IREM-2 (APC/UP-H2/Becton Dickinson)
- Kit de elusión EGA (IMMUCOR GAMMA)
- Buffer salino de fosfatos con albumina de suero bovino al 1% “PBS-BSA al 1%” (Milteny Biotec)
- Mab Thera 100 mg (ROCHE)
- Juego de reactivos para determinación de biometría hemática completa, Cellpack, Stromatolyser 4DL, Stromatolyser 4DS y Sulfolyser (Sysmex)
- Tubos Falcón de poliestireno de 5mL con tapa
- Tubos cónicos (NEST)
- Pipetas automáticas
- Puntillas nuevas
- Reloj cronómetro

## **5.5 Equipos**

- Analizador hematológico automático Sysmex X-1000i
- Citometro de flujo BD FACS Canto™ II
- Centrifuga IEC Centra CL2
- Vortex GENIE 2

## 5.6 Descripción general de la metodología

El estudio fue dividido en dos fases, la primera de ellas “fase I” se buscó comprobar el efecto de enmascaramiento y la efectividad del método de elución por lo que se emplearon muestras de 10 sujetos sanos, seleccionados siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. A las muestras de sangre total en EDTA se les realizó separación de células mononucleares mediante gradiente de densidad con HISTOPAQUE 1077, las células obtenidas eran cuantificadas en el equipo Sysmex X 1000-i y posteriormente se ajustaba concentración de células a  $1 \times 10^6$  en 3 tubos (tubo 1, tubo 2 y tubo 3), el tubo número 1 se le realiza protocolo de marcación de superficie con los anticuerpos correspondientes (CD20, CD19, CD22, IREM-2 y CD14) finalizado el protocolo de marcaje se adquiere en el citómetro de flujo FACS Canto II  $1 \times 10^6$  eventos y se analizaban gráficos de puntos para la selección de población de linfocitos B (población problema) y monocitos (control negativo). A los tubos 2 y 3 se les adiciono  $5 \mu\text{L}$  de Rituximab (Mab Thera) se incubaron durante 30 minutos, se realizó lavado con PBS-BSA 1%, después del lavado el tubo 2 fue sometido a protocolo de marcación de superficie con los anticuerpos mencionados anteriormente y después se adquirieron  $1 \times 10^6$  eventos en el citómetro de flujo; al tubo 3 se le realizó protocolo de elución y después de marcación de superficie y también se adquirieron  $1 \times 10^6$  en el citómetro de flujo, analizando gráficos para selección de población de linfocitos B y monocitos en ambos casos.

En la “fase II” se buscó establecer la capacidad de disociación del método de elución frente a un gradiente de concentración de Rituximab para lo que se emplearon muestras de los pacientes a los que se les había realizado inmunofenotipo para diagnóstico (3 casos de leucemia linfocítica crónica, 1 de leucemia de células pilosas y 1 de un linfoma folicular leucemizado), a las cuales se les realizó separación de células mononucleares mediante gradiente de densidad con HISTOPAQUE 1077, las células obtenidas eran cuantificadas en el equipo Sysmex X 1000-i. En el tubo 1 (bloqueo total) se ajustó la concentración de células a  $1 \times 10^6$  y se adicionaron  $5 \mu\text{L}$  de Rituximab (Mab Thera) se incubó durante 30 minutos, se realizó lavado con PBS-BSA 1%, después fue sometido a protocolo de marcación de superficie con los anticuerpos mencionados anteriormente y después se adquirieron  $1 \times 10^6$  eventos en el citómetro de flujo. Para los tubos 2, 3, 4 y 5 (dilución  $4.166 \times 10^{10}$ ,  $4.166 \times 10^7$ ,  $4.166 \times 10^4$  y  $4.166 \times 10^1$ ) se emplearon cálculos estequiométricos para determinar la cantidad de  $\text{IgG}_1$  (Rituximab) había en un volumen determinado y partiendo de este supuesto se realizaron diluciones seriadas para ajustar su concentración y dichas diluciones se adicionaban a tubos que contenían  $1 \times 10^6$  células, se incubaron 30 minutos, se lavaron con PBS-BSA al 1% y después se sometieron a protocolo de marcación de superficie con los anticuerpos mencionados anteriormente y después se adquirieron  $1 \times 10^6$  eventos en el citómetro de flujo. Para evaluar la capacidad de disociación de la solución Acido-Glicina-EDTA, se montó de forma similar un tubo 1 (explicado anteriormente) aplicando el protocolo de elución posterior al lavado

con PBS y finalizada la disociación realizar marcaje y adquisición de  $1 \times 10^6$  eventos en el citometro de flujo.

Los datos obtenidos de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) para cada marcador en cada población celular se integraron en una base de datos en el programa Excel 2016 y posteriormente analizadas en el programa estadístico SPSS v.22 para determinar si había diferencia entre los grupos.

## **5.7 Métodos**

### **5.7.1 Separación de células mononucleares (CMN) mediante gradiente de densidad**

- Las muestras de sangre total en EDTA se homogenizaron y a una de ellas le realizó una biometría hemática en el equipo XS-1000i (ROCHE), registrando el valor absoluto de leucocitos y linfocitos.
- Se colocó 1.5 mL de HISTOPAQUE 1077 (SIGMA-ALDRICH) en un tubo cónico de 15mL.
- Adicionamos cuidadosamente 3 mL de sangre total sobre el gradiente superior del tubo.
- Se centrifugó a 700 g durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-26°C).
- Una vez cumplido el ciclo de centrifugación, se retiró con cuidado los tubos de la centrifuga y se tomó la capa superior de plasma y células mononucleares y se colocaron en otro tubo.

- Se realizó un lavado de las CMN con solución salina por 2 ocasiones a 2000 rpm durante 7 minutos.
- Se resuspende el paquete de mononucleares en 500  $\mu$ L de PBS.
- Posteriormente se realizó una biometría hemática a cada uno de los tubos y registrando el valor de leucocitos totales.

### **5.7.2 Sensibilización completa de linfocitos B sanos y patológicos con Rituximab**

- Una vez cuantificados las CMN se ajusta la concentración de células a  $1 \times 10^6$  en un tubo.
- Se adicionaron 5  $\mu$ L de Rituximab se homogenizó en vortex y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (25-30 °C) en completa oscuridad.
- Posterior a la incubación se adicionaron 2 mL de PBS-BSA 1% se homogenizó en vortex y se centrifugó a 2000 rpm durante 7 minutos.
- Finalizada la centrifugación se decantó el sobrenadante y se reserva el sedimento para marcación de superficie.

### **5.7.3 Curva de saturación**

- Para la preparación de la curva de saturación partimos del supuesto que 1  $\mu$ L de Rituximab contiene  $4.166 \times 10^{13}$  moléculas de IgG<sub>1</sub> (ver Capítulo V, sección 5.9).

- Se rotulan 4 tubos en orden numérico ascendente (1,2,3,4) y a cada uno se les dispensara 1mL de PBS-BSA 1%.
- Al tubo 1, se le adicionara 1 $\mu$ L de Rituximab, se colocará la tapa y se llevara a vortex para completa homogenización.
- Una vez homogéneo el tubo 1 se tomará 1 $\mu$ L de esa dilución y se colocará al tubo 2, repitiendo el paso de homogenización. Y así de forma consecutiva con el resto de los tubos.

#### **5.7.4 Marcación de superficie**

- Al un tubo con las células se dispensaron 5 $\mu$ L de los siguientes anticuerpos fluorescentes: CD20 (V450/L27/Becton Dickinson), CD19 (PE-cy7/SJ25C1/Becton Dickinson) y CD22 (PerCP-Cy 5.5/S-HCL-1/Becton Dickinson), CD45 (V500-C/2D1/Becton Dickinson), CD14 (APC-H7/M $\phi$ P9/ Becton Dickinson), IREM-2(APC/UP-H2/Becton Dickinson).
- Se homogenizo la mezcla en vortex durante 5 segundos.
- Se Incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Al término de la incubación se adicionaron 2.0 mL de PBS y se homogenizo por inversión.
- Se centrifugo a 2000 rpm durante 7 minutos.
- El sobrenadante fue decantado y el sedimento resuspendido en 200  $\mu$ L de {PBS-BSA al 1%.
- El tubo fue resguardado hasta adquisición en el citometro de flujo.

### 5.7.5 Adquisición de muestras e interpretación de gráficos de puntos

- Se adquirió en el citometro de flujo FACS Canto II <sup>TM</sup> 1.0x10<sup>6</sup> eventos.
- Se realizo el análisis de los gráficos de puntos mediante el software *Infinicyt*<sup>TM</sup> evaluando los eventos adquiridos de la siguiente forma:
  - FSC/SSC: Eliminar debris y dobletes.
  - CD45/SSC: Evaluación de complejidad y tamaño, intensidad de CD45+
  - CD19/CD20: Selección de población de Linfocitos B.
  - CD22/SSC: Confirmación de población de Linfocitos B.
  - IREM-2/CD14: Selección de población de Monocitos.
- Una vez seleccionada la población de linfocitos B y monocitos, registrar el número de eventos correspondientes y realizar calculo en doble plataforma para establecer la concentración de linfocitos B/ $\mu$ L y registrar la IMF de cada anticuerpo para la población problema como para el control negativo.

### 5.7.6 Elución con la solución Ácido-Glicina-EDTA

- Para preparar la solución Ácido-Glicina-EDTA (Immucor), en un tubo se añadieron 4 gotas de solución EGA 1 (Solución de EDTA disódico al 10%) a 16 gotas de solución EGA 2 [Solución de glicina-HCL (0.1 M y pH 1.5)] y se homogenizo en vortex 5 segundos.
- Después se adiciona la solución Acido-Glicina-EDTA a la suspensión de células sensibilizadas con Rituximab y se homogenizo suavemente.

- Inmediatamente se accionó el cronometro contabilizando 1 minuto permitiendo que la mezcla permanezca a temperatura ambiente ( $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ).
- Finalizado el tiempo añadir inmediatamente 4 gotas de la solución EGA 3 [Solución TRIS-NaCl (hidroximetil)-aminometano sódico 1M], mezclar bien y centrifugar 30 segundos a 3400 rpm.
- Descartar el sobrenadante y realizar 2 lavados con 2.0 mL de PBS a 2000 rpm durante 7 minutos.
- Decantar el sobrenadante.
- Resguarde el tubo hasta protocolo de marcación de superficie.

### 5.8 Formulas y cálculos utilizados

Calculo de moléculas  $\text{IgG}_1$  (Rituximab) en un volumen específico:

- Rituximab ( $\text{IgG}_1$ ) tiene un peso molecular de 144,544 Daltons <sup>(12)</sup>.
- 1 vial de Rituximab de 10mL contiene 100 mg de Rituximab.

Entonces:

$$100 \text{ mg de Rituximab} \left( \frac{6.022 \times 10^{20} \text{ Da}}{1 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1 \text{ unidad de } \text{IgG}_1 \text{ Rituximab}}{144544 \text{ Da}} \right) =$$

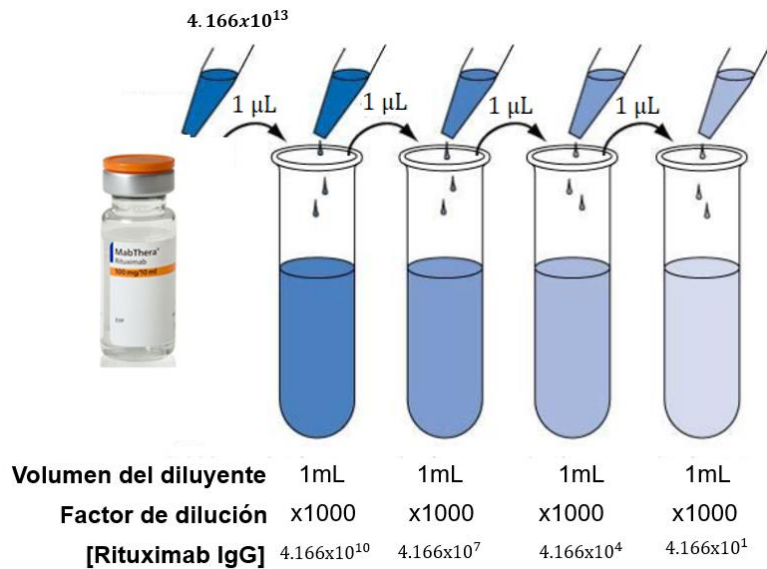
$$4.166 \times 10^{17} \text{ unidades de } \text{IgG}_1 \text{ Rituximab en } 10 \text{ mL}$$

$$1 \text{ mL} \rightarrow 4.166 \times 10^{16} \text{ IgG}_1$$

$$1 \mu\text{L} \rightarrow 4.166 \times 10^{13} \text{ IgG}_1$$



Curva de saturación:



## 5.9 Análisis estadístico

Los resultados de cada fase se integraron en una base de datos elaborada en Excel 2016 y SPSS versión 22.0. Los resultados de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la primera fase fueron agrupados en 3 grupos: basal, bloqueo y elución, para conocer el tipo de distribución de nuestros datos se empleó la prueba de Shapiro-Wilk posterior se evaluó la homogeneidad de varianzas empleando Ji cuadrada de Barlett y para la comparación de medias en muestras paramétricas la prueba de T Student para muestras relacionadas.

## CAPITULO VI

### 6. RESULTADOS

En el periodo de estudio analizamos un total de 15 muestras de sangre periférica, 10 de ellas pertenecientes a los sujetos sanos de la fase I y las 5 muestras restantes pertenecientes a los sujetos de la fase II, con neoplasia CD20+ de diagnóstico reciente. De los sujetos de la fase I se incluyeron 7 (70%) de género femenino y 3 (30%) de género masculino con una media de edad de 30 años (rango: 23-38), en la Tabla VII se muestran los datos de las concentraciones celulares. En cuanto a los sujetos de la fase II todos de género masculino con una media de edad de 59 años (rango: 5-91), el inmunofenotipo de los pacientes correspondía 3 casos a leucemia linfocítica crónica de células B (60%), 1 caso de leucemia de células pilosas (20%) y otro caso de un linfoma folicular leucemizado (20%). Los protocolos de inmunofenotipificación (paneles de anticuerpos, estrategias de adquisición y de análisis) se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos estandarizados por el consorcio *EuroFlow*. En la Tabla VIII se muestran los datos de concentración celular al diagnóstico de los pacientes.

Para la fase I las intensidades medias de fluorescencia se registraron en cada población en el grupo problema (linfocitos B) y el grupo control negativo (monocitos), debido a problemas con la señal emitida por el fluorocromo PerCP-Cy 5.5/S-HCL-1/Becton Dickinson para el marcador CD22, se cambió de fluorocromo a APC//Becton Dickinson, por tal motivo no se pudo comparar IMF

del CD22 contra control negativo debido a que el marcador para IREM-2 en la población de monocitos utilizaba el mismo, sin embargo se logra realizar comparación entre la población de linfocitos B en cada grupo.

**Tabla VII**

<b>Concentraciones celulares en el grupo de sujetos sanos</b>					
<b>Sujeto</b>	<b>Genero</b>	<b>Basal</b>		<b>Protocolo de concentración</b>	
		WBC/ $\mu$ l $\times 10^3$	Linfocitos/ $\mu$ L $\times 10^3$	[CMN]/ $\mu$ L $\times 10^3$	Linfocitos B/ $\mu$ L
1	F	7,04	1,4	5,17	245,0
2	M	6,0	1,09	5,26	158,3
3	M	5,17	1,49	4,84	440,4
4	F	7,96	2,66	10,55	233,2
5	F	4,85	1,2	9,3	392,4
6	M	7,5	3,02	10,89	400,7
7	F	8,62	2,0	7,38	431,7
8	F	6,78	2,77	7,82	131,04
9	F	6,52	1,78	3,82	117,2
10	F	4,68	1,64	5,45	187,4

F= Femenino; M= Masculino; WBC= Leucocitos; CMN = Células mononucleares

**Tabla VIII**

<b>Concentraciones celulares en el grupo de pacientes con neoplasia CD20+</b>				
<b>Paciente</b>	<b>Genero</b>	<b>Dx.</b>	WBC/ $\mu$ l $\times 10^3$	Porcentaje de Células B monoclonales
1	M	LLC-B	21,32	49%
2	M	LLC-B	31,67	67%
3	M	LCP	12,41	60%
4	M	LLC-B	34,90	65%
5	M	LFL	185,16	81%

F= Femenino; M= Masculino; Dx= Diagnóstico; LLC-B= Leucemia linfocítica crónica de células B; LCP= Leucemia de células pilosas; LFL= Linfoma folicular leucemizado; WBC= Leucocitos; CMN = Células mononucleares

## 6.1 Resultados fase I

La distribución de la IMF para los linfocitos B en cada grupo se muestra en las Figuras 3, 4 y 5, en ellas observamos graficas de cajas en función a las IMF para los marcadores CD20, CD19 y CD22 entre el grupo de linfocitos B en cada grupo

(basal, bloqueo y elución) y el respectivo control negativo correspondiente la población de monocitos.

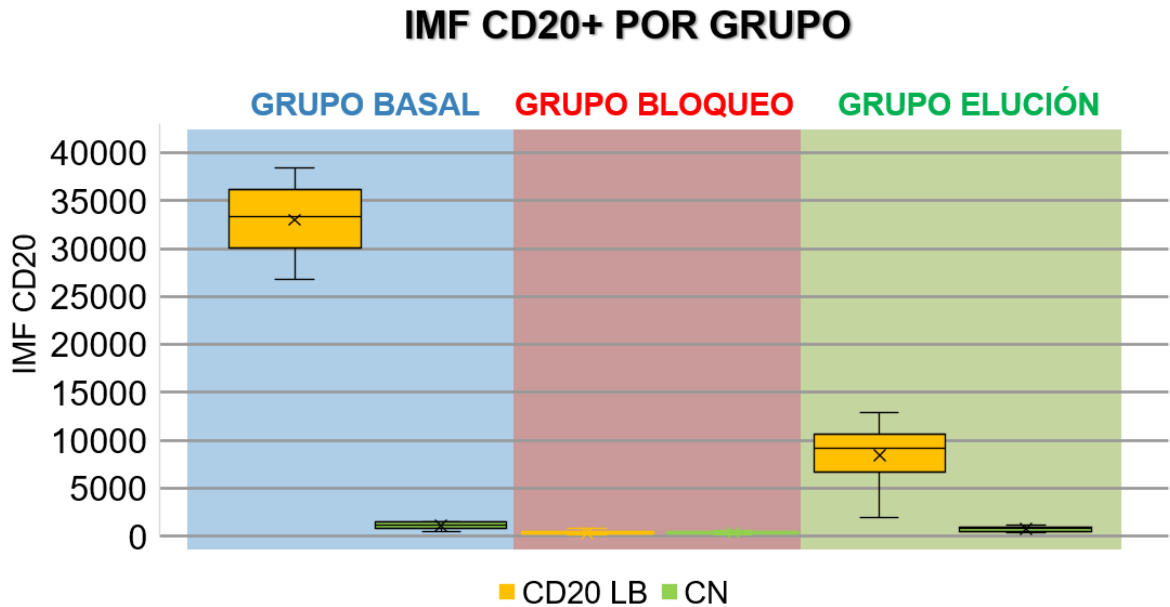


Figura 3. Distribución y comportamiento de la IMF del CD20+ entre el grupo de linfocitos B (en color amarillo) y control negativo (en color verde) por grupo de estudio. En cuanto a la lecturas, en el grupo basal presentó una señal de IMF oscilando entre 25000-38000 para la población de linfocitos B y nula señal en el grupo control negativo (monocitos), despues de realizar sesibilización con Rituximab y posterior marcaje de superficie con anti-CD20 (grupo bloqueo) no detectamos señal del antígeno CD20 observando la población al mismo nivel que nuestro control negativo y para finalizar en el grupo elución donde se retoma señal del antígeno CD20 pero oscilando entre 5000-15000, pero claramente diferenciada de la nula señal en el control normal.

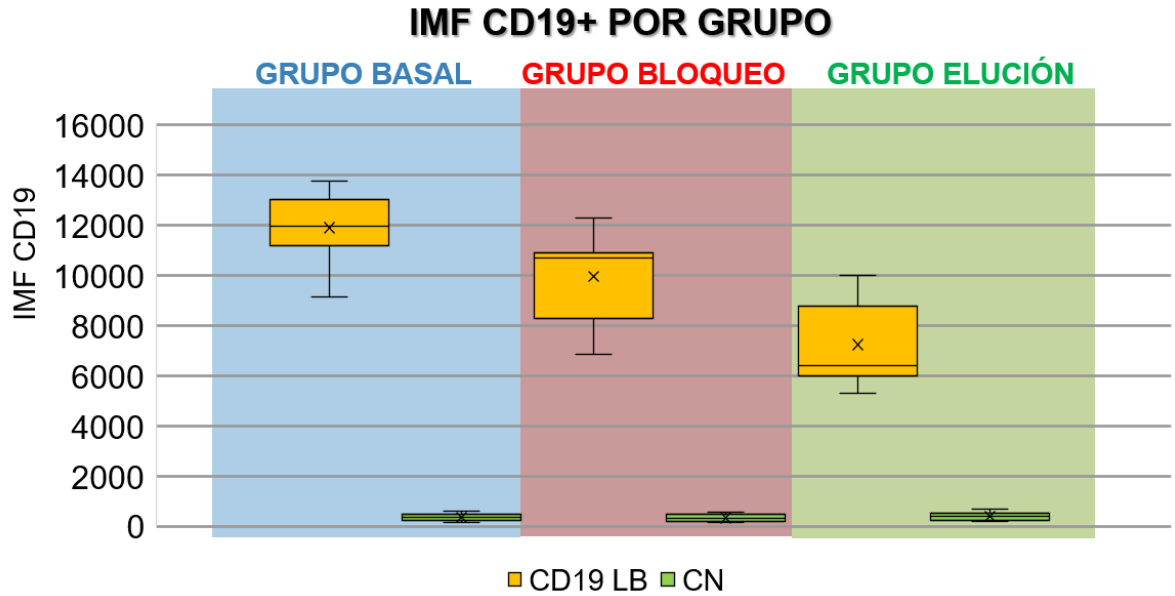


Figura 4. Distribución y comportamiento de la IMF del CD19+ entre el grupo de linfocitos B (en color amarillo) y control negativo (en color verde) por grupo de estudio. La lectura en el grupo basal presentó una señal de IMF oscilando entre 8000-14000 para la población de linfocitos B y nula señal en el grupo control negativo (monocitos), después de realizar sensibilización con Rituximab mantenemos la señal del antígeno CD19 oscilando entre 6500-12000 y en el grupo elución también detectada la señal con rangos de 5000-10000.

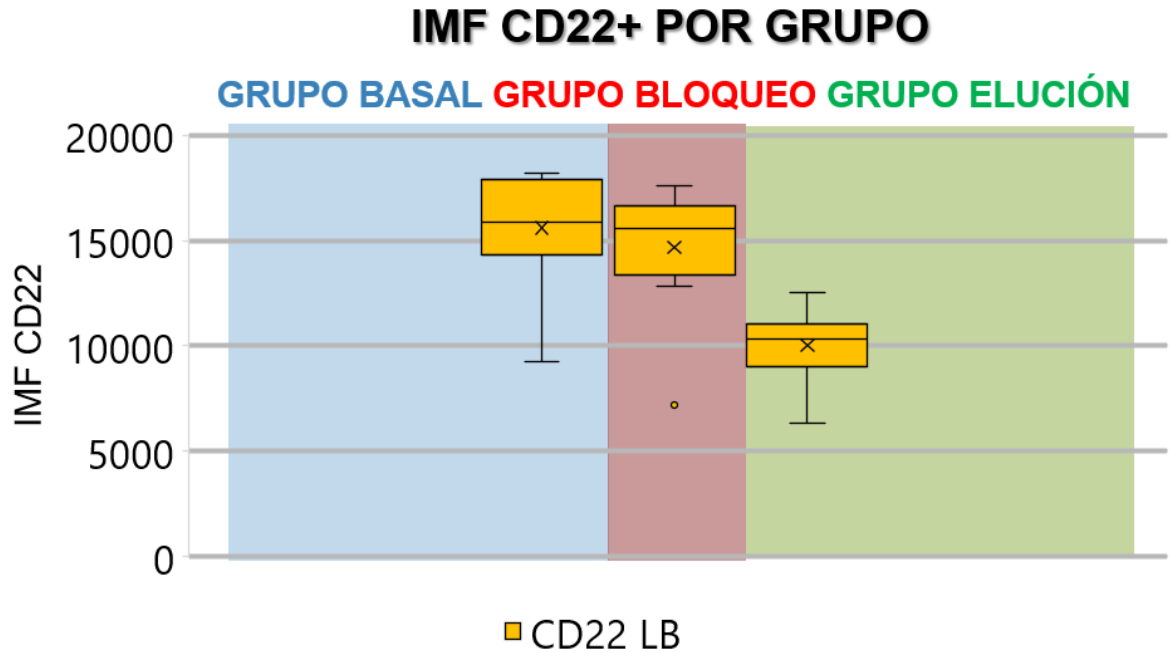


Figura 5. Distribución y comportamiento de la IMF del CD22+ entre el grupo de linfocitos B (en color amarillo) por grupo de estudio. La lectura en el grupo basal presentó una señal de IMF oscilando entre 9000-18000 para la población de linfocitos B, después de realizar sensibilización con Rituximab mantenemos la señal del antígeno CD22 oscilando entre 7000-17000 y en el grupo elución también es detectada la señal con rangos de 5000-10000.

### 6.1.1 Comparación de medias entre IMF de los linfocitos B entre grupos

La distribución de nuestros datos mostraba orden paramétrico y homogeneidad de varianza, por lo que para demostrar la diferencia o similitud entre las IMF de las poblaciones problema y control realizamos una prueba T Student, en la Tabla IX se muestran los resultados.

**Tabla IX**  
**Comparación entre las IMF de los LB entre grupos**

<b>IMF de poblaciones en contraste</b>	<b>Media</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	<b>Valor de P</b>
CD20 LB-Basal – CD20 LB-Bloqueo	32653.87	29868.52 a 35439.22	0.001
CD20 LB-Bloqueo – CD20 Control negativo	-30.69	-129.23 a 67.84	0.499
CD20 LB-Bloqueo – CD20 LB Elución	-8131.94	-10617.6 a -5646.27	0.001
CD20 LB Elución – CD20 Control negativo	7698.18	5401.31 a 35439.22	0.001

*IMF= Intensidad media de fluorescencia LB= Linfocitos B CN= control negativo*

### 6.2 Resultados fase II

Para la fase 2 se recolectaron los datos de la curva de saturación se presentan en función a IMF y en función al porcentaje celular bloqueado. En las Figuras 6 a 15 se presentan las gráficas correspondientes a cada paciente donde se muestra la IMF de la población en cada una de las fases (basal, curva de saturación, y posterior al protocolo de elución) y la cantidad de células que permanecen bloqueadas al someterlas a diferentes concentraciones de Rituximab, recordando que la IMF corresponde solo la población libre (sin bloqueo).

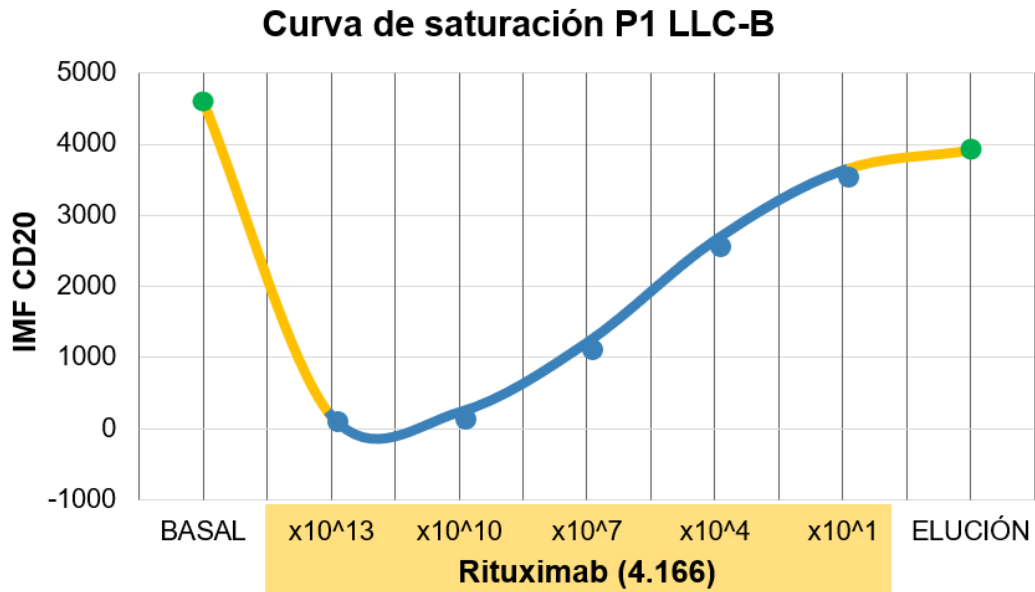


Figura 6. Distribución de la IMF de la población de LLC-B del paciente #1 en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto correspondiente a la lectura basal de CD20 en las células de LLC-B oscilando entre 4000-5000, continuando con los puntos azules que representan las diferentes concentraciones de Rituximab con las que se bloquearon las células, en la curva observamos un comportamiento sigmoide que asciende en la señal detectada conforme la concentración del anticuerpo disminuye debido a que una menor cantidad de sitios son bloqueados por lo que una mayor cantidad de células son detectadas y el punto final representa la lectura de IMF después del protocolo de elución con un valor equiparable al de la población basal.



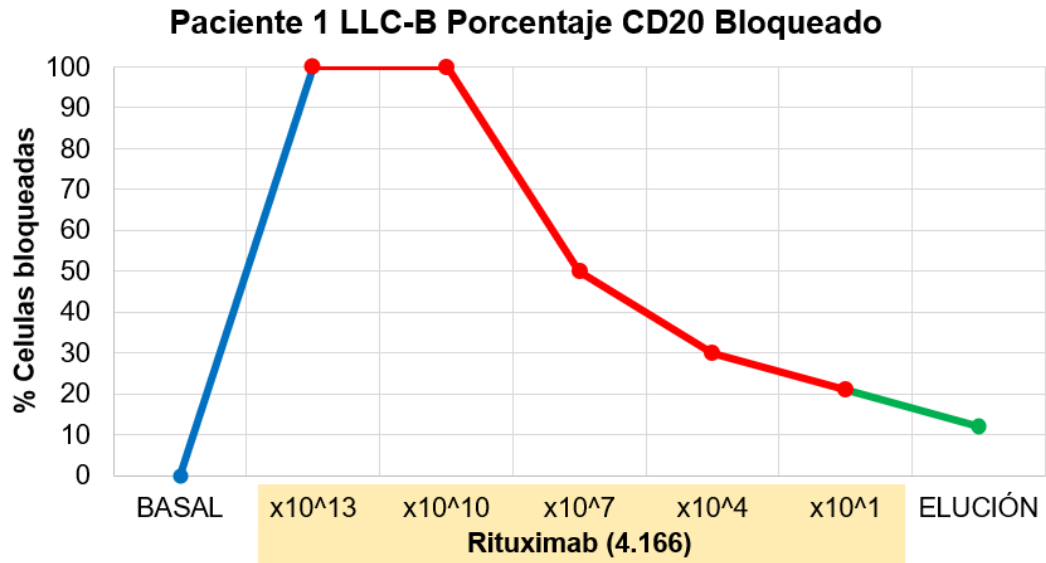


Figura 7. Distribución de la concentración de células CD20+ bloqueadas del paciente #1 (LLC-B) en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto (azul) correspondiente a la fase basal donde no existe población bloqueada; del punto número 2 al 5 (rojo) observamos el efecto de concentración del Rituximab en el bloqueo antigénico, conforme disminuye la concentración menor cantidad de sitios antigénicos son bloqueados y por último, el punto (verde) que corresponde al marcaje después de la elución donde observamos una mínima cantidad de células con sitios bloqueados después de aplicar el protocolo.

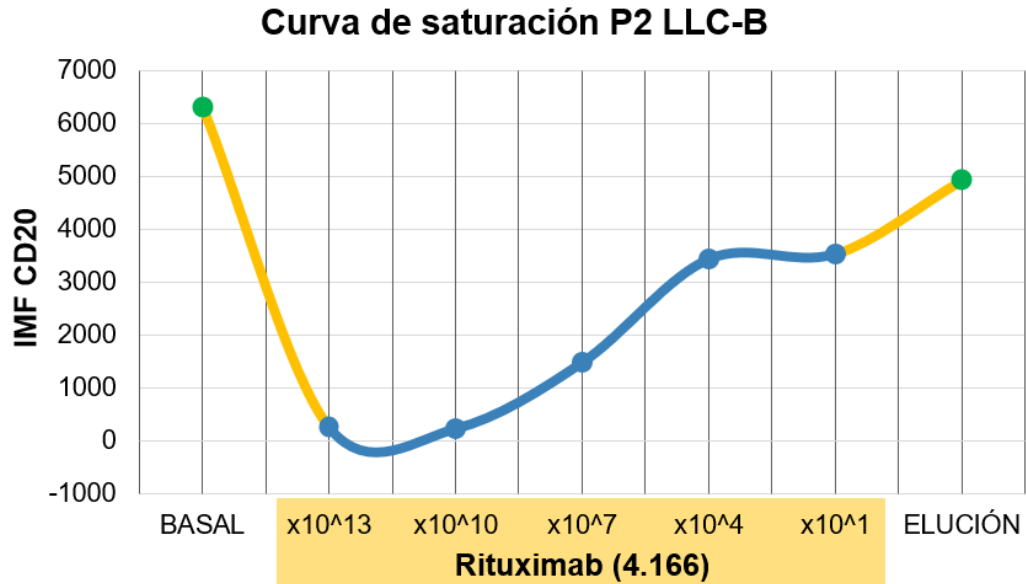


Figura 8. Distribución de la IMF de la población de LLC-B del paciente #2 en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto correspondiente a la lectura basal de CD20 en las células de LLC-B oscilando entre 6000-7000, continuando con los puntos azules que representan las diferentes concentraciones de Rituximab con las que se bloquearon las células, en la curva observamos un comportamiento sigmoide que asciende en la señal detectada conforme la concentración del anticuerpo disminuye debido a que una menor cantidad de sitios son bloqueados por lo que una mayor cantidad de células son detectadas, observando que en los dos últimos logaritmos la IMF permaneció casi al mismo nivel y el punto final representa la lectura de IMF después del protocolo de elución con un valor equiparable al de la población basal.

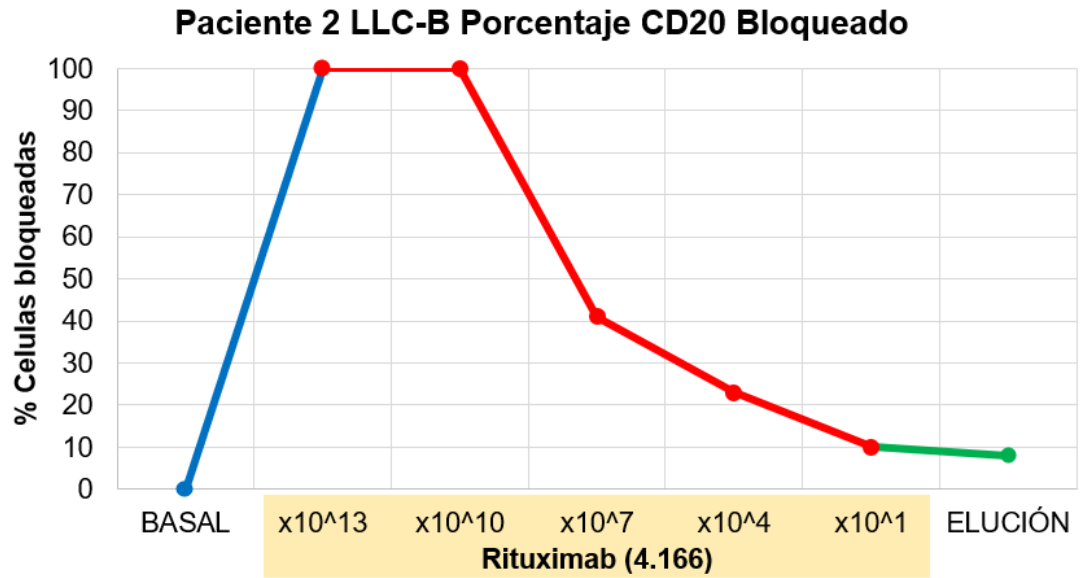


Figura 9. Distribución de la concentración de células CD20+ bloqueadas del paciente #2 (LLC-B) en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto (azul) correspondiente a la fase basal donde no existe población bloqueada; en el punto número 2 al 5 (rojo) observamos el efecto de concentración del Rituximab en el bloqueo antigénico, conforme disminuye la concentración menor cantidad de células son bloqueadas y por último el punto (verde) que corresponde al marcaje después de la elución donde observamos una mínima cantidad de células con sitios bloqueados después de aplicar el protocolo.

### Curva de saturación P3 Leucemia de Células Pilosas

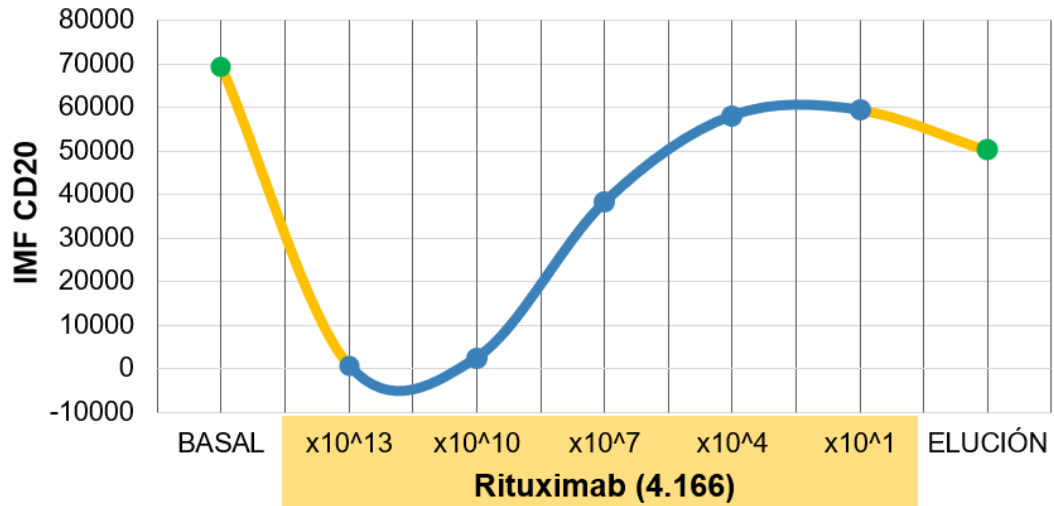


Figura 10. Distribución de la IMF de la población de LCP del paciente #3 en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto correspondiente a la lectura basal de CD20 en las células de LLC-B oscilando alrededor de 70000, continuando con los puntos azules que representan las diferentes concentraciones de Rituximab con las que se bloquearon las células, en la curva observamos un comportamiento sigmoideal que asciende en la señal detectada conforme la concentración del anticuerpo disminuye debido a que una menor cantidad de sitios son bloqueados por lo que una mayor cantidad de células son detectadas y el punto final representa la lectura de IMF después del protocolo de elución donde observamos que la IMF es un poco menor a comparación de la lectura previa en el bloqueo, sin embargo con un valor equiparable al de la población basal.

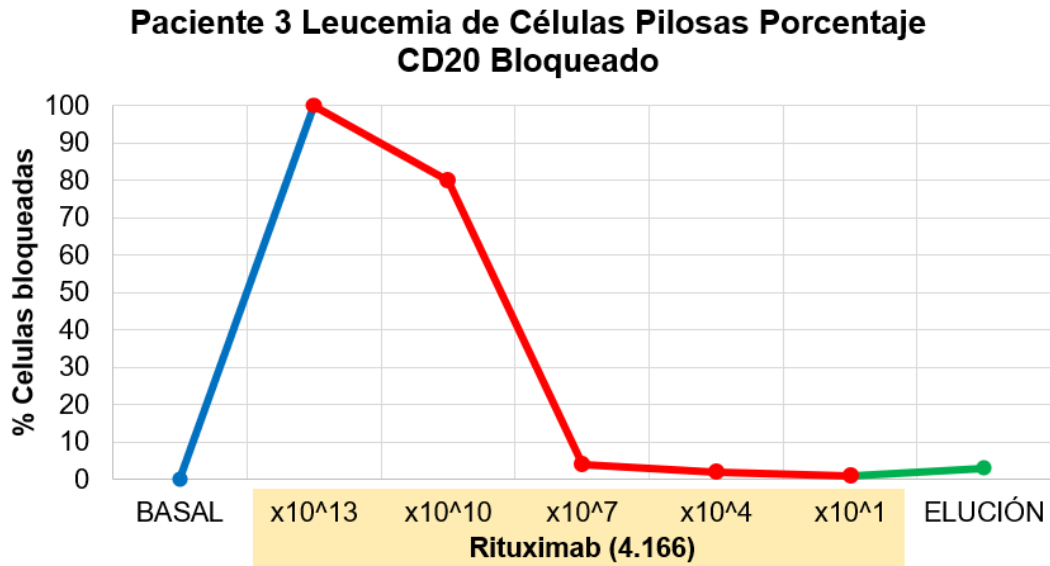


Figura 11. Distribución de la concentración de células CD20+ bloqueadas del paciente #3 (LCP) en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto (azul) correspondiente a la fase basal donde no existe población bloqueada; en el punto número 2 al 5 (rojo) observamos el efecto de concentración del Rituximab en el bloqueo antigénico, en este caso conforme disminuye el logaritmo de concentración observamos que después de logaritmo  $10^7$  pocos sitios fueron saturados debido a la alta densidad antigénica de este linaje y por último el punto (verde) que corresponde al marcaje después de la elución donde observamos una mínima cantidad de células con sitios bloqueados después de aplicar el protocolo.

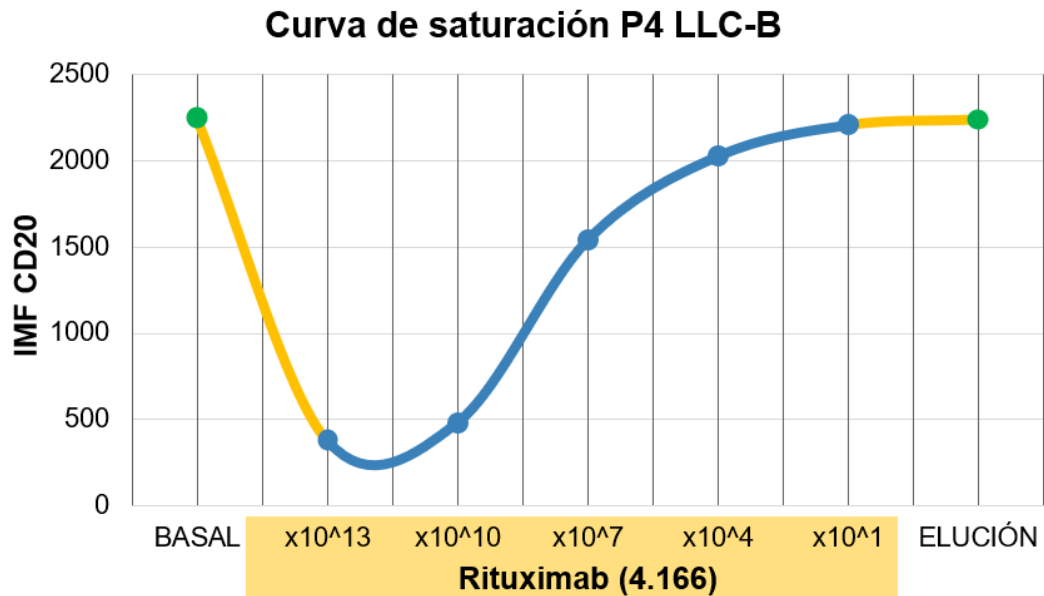


Figura 12. Distribución de la IMF de la población de LLC-B del paciente #4 en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto correspondiente a la lectura basal de CD20 en las células de LLC-B oscilando entre 2000-2500, continuando con los puntos azules que representan las diferentes concentraciones de Rituximab con las que se bloquearon las células, en la curva observamos un comportamiento sigmoide que asciende en la señal detectada conforme la concentración del anticuerpo disminuye debido a que una menor cantidad de sitios son bloqueados por lo que una mayor cantidad de células son detectadas y el punto final representa la lectura de IMF después del protocolo de elución con un valor equiparable al de la población basal.

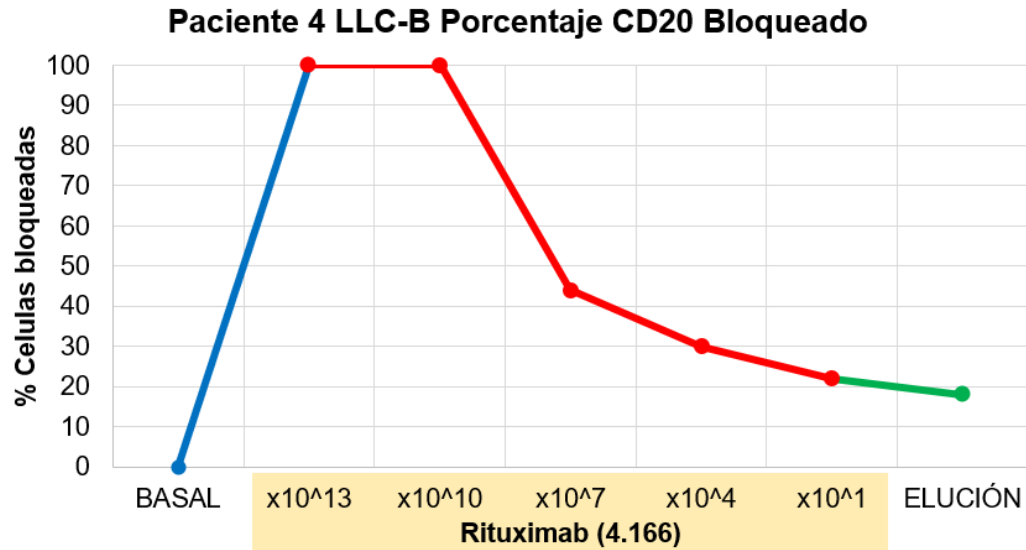


Figura 13. Distribución de la concentración de células CD20+ bloqueadas del paciente #4 (LLC-B) en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto (azul) correspondiente a la fase basal donde no existe población bloqueada; en el punto número 2 al 5 (rojo) observamos el efecto de concentración del Rituximab en el bloqueo antigénico, en este caso conforme disminuyo el logaritmo de concentración a y por último el punto (verde) que corresponde al marcaje después de la elución donde observamos una mínima cantidad de células con sitios bloqueados después de aplicar el protocolo

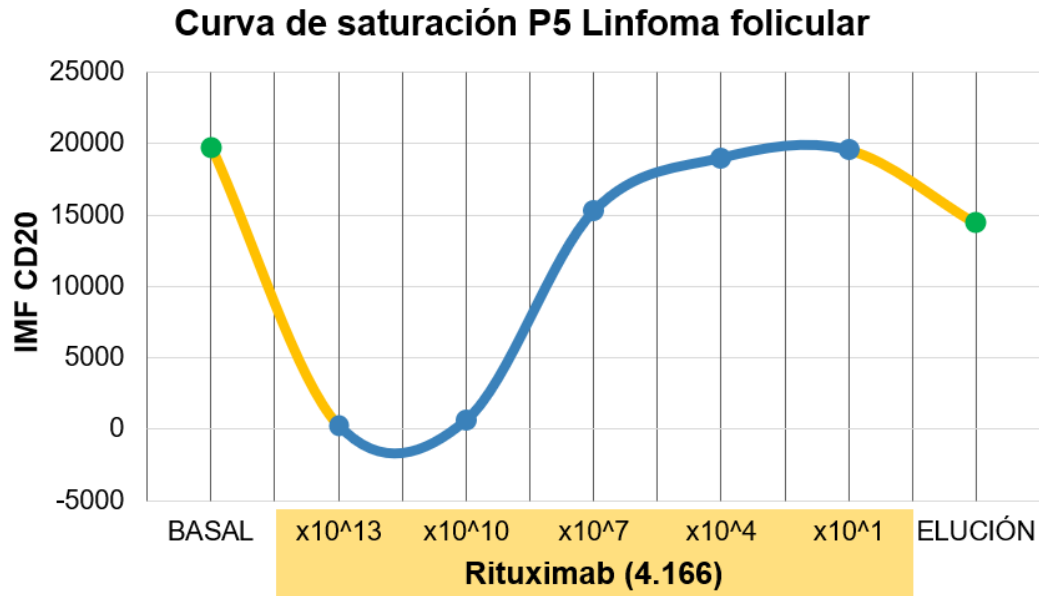


Figura 14. Distribución de la IMF de la población de LF del paciente #5 en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto correspondiente a la lectura basal de CD20 en las células de linfoma folicular oscilando cerca de 20000, continuando con los puntos azules que representan las diferentes concentraciones de Rituximab con las que se bloquearon las células, en la curva observamos un comportamiento sigmoide que asciende en la señal detectada conforme la concentración del anticuerpo disminuye debido a que una menor cantidad de sitios son bloqueados por lo que una mayor cantidad de células son detectadas y el punto final representa la lectura de IMF después del protocolo de elución emitiendo una señal menor en comparación a los 2 últimos puntos en el bloqueo pero con un valor equiparable al de la población basal.



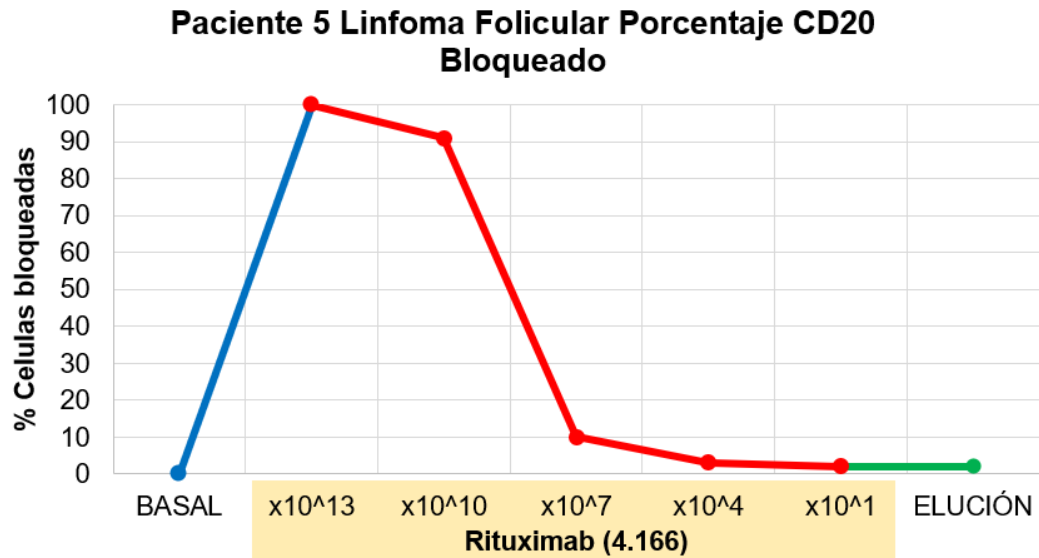


Figura 15. Distribución de la concentración de células CD20+ bloqueadas del paciente #5 (Linfoma folicular) en curva de saturación. En la imagen observamos el primer punto (azul) correspondiente a la fase basal donde no existe población bloqueada; en el punto número 2 al 5 (rojo) observamos el efecto de concentración del Rituximab en el bloqueo antigénico, en este caso conforme disminuye el logaritmo de concentración observamos que después de logaritmo  $10^7$  pocos sitios fueron saturados debido a la alta densidad antigénica de este linaje y por último el punto (verde) que corresponde al marcaje después de la elución donde observamos una mínima cantidad de células con sitios bloqueados después de aplicar el protocolo.

## CAPITULO VII

### 7. DISCUSIÓN

El método Acido-Glicina-EDTA es la técnica más ampliamente utilizada para el estudio de antígenos eritrocitarios que están cubiertos con aloanticuerpos y autoanticuerpos de naturaleza IgG<sub>1</sub> y que generan una prueba de Coombs directo positiva; y que ha probado ser más eficiente que otros métodos (42, 43, 58). En el presente trabajo se muestra por primera vez como el protocolo también es efectivo en la membrana leucocitaria para el estudio de antígenos sensibilizados con una terapia monoclonal, evidenciando que la manipulación técnica ni el cambio en el pH altera significativamente la expresión ni la inmunoreactividad de antígenos de importancia para la inmunofenotipificación de los linfocitos B.

En primera instancia se muestran datos contundentes en la distribución de IMF de los antígenos estudiados en la población de LB (ver Capítulo VI, sección 6.1), enfocándonos en CD20 se mostró la ausencia total de señal después del protocolo de sensibilización con Rituximab en comparación a la señal obtenida en su grupo basal, observando claramente el fenómeno de enmascaramiento con la terapia monoclonal; dicha señal en CD20 fue retomada después del protocolo de elución no de forma tan eficiente como en el grupo basal, sin embargo con la intensidad suficiente para discrepar entre una población negativa de una positiva lo anterior sin alteración significativa en los otros dos antígenos estudiados (CD19 y CD22), estas disminuciones parciales en la IMF las atribuimos a la manipulación técnica (perdida celular en lavados, tiempos de incubación, tiempo de

adquisición). Para la comparación entre grupos se realizó entre poblaciones antes y después de tratamientos y empleamos la población de monocitos como control negativo dado que este linaje no posee el antígeno CD20, encontrando en el análisis un valor de  $P$  significativo para la comparación entre la población de LB del grupo basal y el grupo bloqueo, y un valor no significativo de  $P$  entre el grupo de LB del grupo bloqueo y el control negativo, lo que nos habla que a pesar de ser la misma población, después de la sensibilización con Rituximab la población de LB no emite señal para CD20, similar al comportamiento de nuestro control negativo, lo que valida el fenómeno de enmascaramiento con Rituximab, este fenómeno había sido reportado con anterioridad pero se atribuía a un fenómeno de regulación negativa, identificando luego que se debía a un enmascaramiento (28, 38). En cuanto a la comparación con valor significativo de  $P$  entre el grupo de LB del grupo bloqueo con el grupo elución y de este con el control negativo, nos habla de la efectividad del protocolo de elución, de no emitir señal para CD20 y comportarse de manera similar al control negativo, se retoma la señal para antígeno y es claramente diferenciado de la población negativa. La presentación secuencial en gráficos de puntos donde se muestran las poblaciones de linfocitos B y el control negativo partiendo desde la determinación basal, la sensibilización con Rituximab y el protocolo de elución se pueden observar en la Figura 16.

En esta fase del estudio queda claramente descrito que este tipo de terapias interfieren en protocolos “*in vitro*” de citometría de flujo para la inmunofenotipificación como lo ha reportado otros grupos (39, 63), y que el método

de elución permite la disociación del complejo Rituximab-CD20 para posterior identificación del antígeno con anticuerpos fluorescentes.

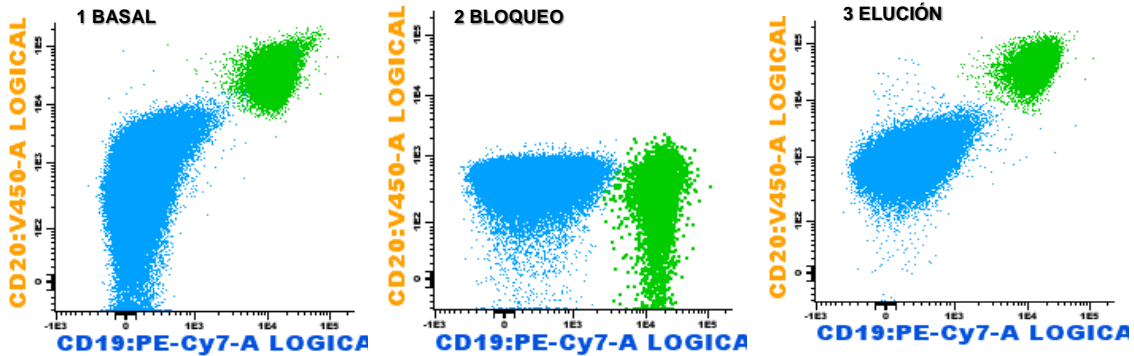


Figura 16. Representación secuencial del cada una de las fases del protocolo (basal, bloqueo, elución). Cada una de las imágenes nos muestran gráficos biparamétrico CD19 PE-Cy7/CD20 V450, la población de linfocitos B en color verde y la de monocitos (control negativo) en azul, en el número uno se muestran los gráficos de puntos de ambas poblaciones en estado basal, observamos la población homogénea de LB positiva para ambos marcadores; en el gráfico número 2 después del protocolo de sensibilización con Rituximab se aprecia que a la población de LB continua siendo detectado el marcador CD19 y ausencia del marcador CD20+ posicionándose al mismo nivel que el control negativo y por último el gráfico número 3, muestra las poblaciones después del protocolo de elución donde vemos que la población de LB retoma señal para CD20+ de forma similar a la muestra basal.

En cuanto los efectos de la concentración del Rituximab sobre el bloqueo de los sitios antigénicos CD20+ de las células, observamos el mismo comportamiento en los 5 pacientes, donde conforme disminuye el logaritmo de concentración del anticuerpo monoclonal la cantidad de sitios antigénicos que se bloquean disminuye por lo que una mayor proporción de células es detectada mediante el anticuerpo fluorescente, lo que es equiparable a poblaciones de eritrocitos cuando son sensibilizados en diferente título de alo o autoanticuerpos estos complejos generan aglutinaciones en diferentes proporciones en una prueba de

antiglobulina directa, que van desde una reacción positiva débil (+/-) hasta las cuatro cruces (4+)<sup>(64)</sup>. En cuanto a la efectividad del método de elución en la superficie leucocitaria se observa que tanto la IMF como la concentración de células bloqueadas posterior al protocolo de elución son equiparable a las lecturas basales de cada caso en particular. Otro aspecto a resaltar es el comportamiento en el bloqueo por la terapia monoclonal, en donde la densidad antigénica de las poblaciones neoplásicas en estudio y la concentración de Rituximab juegan un papel importante dado a que las poblaciones con una expresión elevada de CD20 en su superficie como en el linfoma folicular o la leucemia de células pilosas observamos que en los logaritmos de estudio de mediana concentración solo un pequeño porcentaje de células era saturado en su totalidad.

## **CAPITULO VIII**

### **8. CONCLUSIÓN**

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, es decir el Rituximab interfiere en el protocolo de citometría de flujo para identificar células B y puede ser eluido mediante un cambio en el pH con solución Ácido-Glicina-EDTA.

Los resultados del estudio confirman que el cambio de pH no altera el nivel de expresión ni la inmunoreactividad de los antígenos de la célula B para su correcta inmunofenotipificación.

## CAPITULO IX

### 9. PERSPECTIVAS

1. Debido a las características fisicoquímicas de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, se infiere que el método de elución puede disociar cualquiera de estos anticuerpos.
2. Comparar el método con las otras alternativas para detección de antígenos enmascarados como anticuerpos anti-terapia monoclonal, anticuerpos multiepitopo.
3. Establecer la efectividad precisa del protocolo de elución de la relación [Antígeno]/Célula con un método "QUANTIBrite".

## CAPITULO X

### 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Brent L. Wood, Maria Arroz, David Barnett, Joseph DiGiuseppe BG, Steven J. Kussick, Teri Oldaker, Mark Shenkin ES and PW. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. *Cytom Part B* .... 2007;85(December 2006):77–85.
2. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163–76.
3. Kaushansky Kenneth, Lichtman Marshall A., Prchal Josef T, Levi Marcel M., Press Oliver W., Burns Linda J. CMA. Williams Hematology. 9 Edition. Mc Graw Hill Medical; 2016.
4. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908–75.
5. Craig FE, Foon K a, Dc W. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms Review article Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. 2013;111(8):3941–67.
6. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2016;90(1):47–53.
7. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, Sluijs-gelling AJ Van Der, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(3):347–58.
8. Van Meerten T, Hagenbeek A. CD20-Targeted therapy: The next generation of antibodies. *Semin Hematol*. 2010;
9. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The Biology of CD20 and Its Potential as a Target for mAb Therapy. *B Cell Trophic Factors B Cell Antagon Autoimmune Dis*. 2004;8:140–74.
10. Huh YO, Keating MJ, Saffer HL, Jilani I, Lerner S, Albitar M. Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(3):437–43.



11. Teeling JL, Mackus WJM, Wiegman LJJM, van den Brakel JHN, Beers SA, French RR, et al. The Biological Activity of Human CD20 Monoclonal Antibodies Is Linked to Unique Epitopes on CD20. *J Immunol.* 2006;177(1):362–71.
12. Miranda-Hernandez MP, Lopez-Morales CA, Ramirez-Ibanez ND, Pinã-Lara N, Pérez NO, Molina-Perez A, et al. Assessment of physicochemical properties of rituximab related to its immunomodulatory activity. *J Immunol Res.* 2015;2015.
13. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol.* 1998;51(5):364–9.
14. Lili Wang, Fatima Abbasi, Adolfas K. Gaigalas RFV and GEM. Comparison of Fluorescein and Phycoerythrin Conjugates for Quantifying CD20 Expression on Normal and Leukemic B-Cells. *Cytom Part B ....* 2007;85(December 2006):77–85.
15. Maloney DG, Pez AJG-L, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B2 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood.* 1997;Vol. 90 No(September 15, 1997):2188–95.
16. Johnson P, Glennie M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin Oncol.* 2003;30(1 SUPPL. 2):3–8.
17. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. 2008;613–26.
18. Brunton Laurence L., Chabner Bruce A., Knollmann Björn C., 2011 G& G. Las bases farmacológicas de la terapéutica. In: 12<sup>a</sup>. Mc Graw Hill; 2011. p. P.1745-174.
19. Mian IS, Bradwell a R, Olson a J. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol.* 1991;217(1):133–51.
20. Rojas-Espinosa Ó. Inmunología (de memoria). 3 Edición. Medica Panamericana; 2006. 525 p.
21. Judd WJ. Elution - Dissociation of antibody from red blood cells: Theoretical and practical considerations. *Transfus Med Rev.* 1999;13(4):297–310.
22. Jaime-Pérez JC, Treviño-Reyna G, Aguilar-Calderón P, Cantú-Rodríguez OG, Marfil-Rivera LJ, Gómez-Almaguer D. Contributions of a regional approach to document hematologic disease in Mexico: a 10-year experience in an open population. *Hematology.* 2018;0(0):1–7.
23. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80- ).* 2011;331:1565–70.

24. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615–27.
25. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer.* 2012. p. 278–87.
26. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): Mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7359–68.
27. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res.* 1999;5(3):611–5.
28. Jilani I, Brien SO, Manshuri T, Thomas D a, Thomazy V a, Imam M, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Prism.* 2003;102(10):3514–20.
29. Ferreri AJ, Dognini GP, Verona C, Patriarca C, Doglioni C, Ponzoni M. Re-occurrence of the CD20 molecule expression subsequent to CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2007;92(1):1–2.
30. Seliem RM, Freeman JK, Steingart RH, Hasserjian RP. Immunophenotypic changes and clinical outcome in B-cell lymphomas treated with rituximab. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14(1):18–23.
31. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, et al. Acquirement of Rituximab Resistance in Lymphoma Cell Lines Is Associated with Both Global CD20 Gene and Protein Down-Regulation Regulated at the Pretranscriptional and Posttranscriptional Levels. *Cancer Cancer Res.* 2008;14(5):1561–71.
32. Sonoki T, Li AEY, Miyanishi AES, Matsuoka H, Mori AEI, Nakakuma AEH. Establishment of a novel CD20 negative mature B-cell line , WILL2 , from a CD20 positive diffuse large B-cell lymphoma patient treated with rituximab. *Int J Hematol.* 2009;89:400–2.
33. Sugimoto T, Tomita A, Hiraga J, Shimada K, Kiyoi H, Kinoshita T, et al. Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: Downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(1):48–53.
34. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 2007;67(3):1270–81.
35. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: Implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene.* 2007;26(25):3629–36.
36. Van Meerten T, Van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB.

Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4027–35.

37. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-wilson A, Laurie H, et al. Diffuse large B-cell lymphoma : reduced CD20 expression is associated with an inferior survival Diffuse large B-cell lymphoma : reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. 2012;113(16):3773–80.
38. Cragg, Mark S., C. Bayne, M. Lllidge Timothy, Valerius Thomas, Johnson Peter W.N. GMJ. Apparent modulation of CD20 by rituximab: an alternative explanation. *Blood.* 2004;103(10):3989–90.
39. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017;31(10):2094–103.
40. Howard PL. Principles of antibody elution. *Transfusion.* 1981;21(5):477–82.
41. Vald YA, Hern AB. Procedimiento para la Detección de Anticuerpos Eritrocitarios. *Revi Cuba Hematol Inmunol Hemoter.* 2001;17(2):98–107.
42. Katharia R, Chaudhary R. Removal of antibodies from red cells: Comparison of three elution methods. *Asian J Transfus Sci.* 2013;7(1):29.
43. Burin Des Roziers N, Squalli S. Removing IgG antibodies from intact red cells: Comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. *Transfusion.* 1997;37(5):497–501.
44. LANDSTEINER K, MILLER CP. Serological Studies On The Blood Of The Primates. *J Exp Medicie.* 1925;42(6):863–72.
45. Rubin H. Antibody elution from red blood cells. *J Clin Pathol.* 1963;16:70–3.
46. Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies from Intact Erythrocytes. *Vox Sang.* 1977;33(5):280–5.
47. Bush. A modified one-stage acid ehition technique forallo- and autoantibodies. *Transfusion.* 1978;18:388.
48. Eicher CA, Wallace ME FS. The Lui elution technique: A simple freezing method for antibody elution. *Transfusion.* 1978;18:647.
49. Branch DR, Sy Siok Hian AL PL. A new elution procedure using a noninflammable organic solvent. *Transfusion.* 1980;20:635.
50. Martin C, Ribera A, Argelagues E, Duran-Suarez JR, Triginer J. Antibody elution from red blood cells by chloroform and trichloroethylene. *Transfusion.* 1982;22(5):359–61.

51. Deisting B, Douglas D ES. D-limonene: A xylene substitute for elution procedures. *Transfusion*. 1986;26:549.
52. Ellisor SS, Papenfus L SE. Dichloromethane (DCM) elution procedure 22:409, 1982. *Transfusion*. 1982;22:409.
53. Chan-Shu SA, Blair O. A New Method of Antibody Elution From Red Blood Cells. *Transfusion*. 1979;19(2):182–5.
54. Bueno R, Garratty G, American F, Cross R, Services B, Region LAC, et al. Elution of Antibody from Red Blood Cells Using Xylene-A Superior Method. *Transfusion*. 1981;21(2):0–5.
55. Bird GWG, Wingham J. A new method for elution of erythrocyte-bound antibody. *Acta Haematol*. 1972;47(6):344–7.
56. CA, Jimerfield. A rapid and simple method for preparing red cell eluates using ultrasound. *J Am Med Technol*. 1977;39:187–9.
57. Meier TJ, Wilkinson SL UG. Elution of antibody from sensitized red blood cells using a conventional microwave oven. *Transfusion*. 1983;23:411.
58. Kosanke J, McDowell MA SI. Treatment of DAT positive red cells with EDTA-glycine acid for antigen typing. *Transfusion*. 1989;29:57S.
59. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(5):565–76.
60. Julleis J, Sapp C KR. Glycine-EDTA as a substitute for AET in the inactivation of Kell System antigens on red blood cells. *Transfusion*. 1992;32:14S.
61. Liew Y, Uchikawa M. Loss of Er antigen in very low pH buffers. *Transfusion*. 1987;23:442–3.
62. Champagne K, Spruell P, Chen J, Voll L, Schlanser G. EDTA glycine-acid vs chloroquine diphosphate treatment for stripping Bg antigens from red blood cells. *Transfusion*. 1996;36:21S.
63. Foran JM, Norton AJ, Micallef INM, Taussig DC, Amess JAL, Rohatiner AZS, et al. Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal anti-CD20): A retrospective cohort analysis. *Br J Haematol*. 2001;114(4):881–3.
64. Fung Mark K., Grossman Brenda J., Hillyer Christopher D. WCM. AABB Technical Manual. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2014.

# RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Eli de Jesús Fuentes Chávez

Candidato para el Grado de Maestría en Laboratorio de Hematología

Tesis:

“DESARROLLO DE UN MÉTODO *IN VITRO* RÁPIDO Y SIMPLE PARA LA ELUCIÓN DE ANTI-CD20 CON UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO-GLICINA-EDTA PARA LA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LINFOCITOS B SENSIBILIZADOS CON RITUXIMAB”.

Campo de estudio: Hematología clínica

Biografía:

Datos personales: Nacido en Saltillo Coahuila el 04 de Junio de 1991.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Coahuila con el Grado de Químico Farmacobiólogo en el 2013, segundo lugar de generación y con reconocimiento EGEL de desempeño satisfactorio.