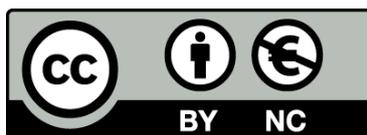




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Desarrollo de metodologías citómicas avanzadas aplicadas al diagnóstico de hemopatías

Jorge Bardina Santos



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Departament de Ciències Fisiològiques**

**Programa de Doctorado en Biomedicina**

# **“Desarrollo de metodologías citómicas avanzadas aplicadas al diagnóstico de hemopatías”**

Memoria de Tesis presentada por

**Jorge Bardina Santos**

Para optar al Grado de

**Doctor en Biomedicina**





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Departament de Ciències Fisiològiques**

**Programa de Doctorado en Biomedicina**

# **“Desarrollo de metodologías citómicas avanzadas aplicadas al diagnóstico de hemopatías”**

Memoria de Tesis presentada por

**Jorge Bardina Santos**

Para optar al Grado de

**Doctor en Biomedicina**

Investigación realizada en el Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Jordi Pétriz González

y la tutoría de la Dra. Pepita Giménez Bonafé

Jorge Bardina Santos

El Doctorando

Jordi Pétriz González

El Director de Tesis

Pepita Giménez Bonafé

La Tutora de Tesis

**Barcelona, 2021**



El Dr. Jordi Pétriz González, líder del Grupo de Investigación de Citómica Funcional del Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras del Campus ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona),

CERTIFICA:

Que Jorge Bardina Santos ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo de investigación que se expone en la memoria de Tesis titulada “Desarrollo de metodologías citómicas avanzadas aplicadas al diagnóstico de hemopatías” para optar al Grado de Doctor en Biomedicina por la Universidad de Barcelona.

Que este trabajo se ha llevado a cabo en Grupo de Investigación de Citómica Funcional del Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras, Campus ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona).

Y para que así conste, se firma el presente certificado:

Jordi Pétriz González  
El Director de Tesis

Jorge Bardina Santos  
El Doctorando

**Barcelona, 2021**



***A Aurora y Ali,***  
*Que superasteis los límites de la medicina.*



## AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

En este momento de mi vida, en que estoy a punto de finalizar la Tesis, solo puedo pensar en gratitud a todas las personas que habéis creído en mí y por hacerlo posible. Alcanzar este nivel, no ha sido fácil, nunca imagine todo el esfuerzo y sacrificio que ha supuesto, pero me siento orgulloso de haber podido alcanzar el que seguramente será uno de mis mayores retos tanto profesional como personal, y que sin todos vosotros no hubiera sido posible.

Sois muchos los que en uno u otro momento habéis formado parte de esta etapa, y es por ello por lo que os quiero dar mi sincera gratitud.

En primer lugar, estoy eternamente agradecido a mi familia, mis padres **Jorge y Aurora**, por enseñarme que la vida es una continua lucha, y que pese las dificultades las cosas siempre acaban bien; a mis hermanas **Aurora y Marta**, a Aurora por cada sonrisa y amor que me daba y a Marta por apoyarme siempre, ha sido imprescindible para llegar a lo que soy hoy día. A **Ali**, mi Golden Retriever, cuya enfermedad hizo decantar mi carrera por la ciencia.

También agradecer a mi pareja **Sara**, por su cariño, paciencia y gran apoyo emocional en momentos difíciles. A sus padres, **Porfirio y Andrea**, a su hermana **Raquel** y su hermano **Raúl**, a su pareja **Esther** y a mi sobrino **Leo**; por ser una segunda familia y que siempre os agradeceré todo lo que habéis hecho por mí.

A grandes amigos de la familia **J. A. Pujante** por su afecto y ayuda, así como a **Francesc e Inés** y, a **Josemaría y Olga**. También a **Pepi, Dani, Erica y Grisela**, por todos estos años.

Al grupo de Citómica Funcional, un equipo increíble y que me ha permitido desarrollarme como profesional aprendiendo prácticamente todo. En especial a mi director de Tesis, **Jordi Petriz**, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en este gran equipo, por tu confianza y soporte durante todo este tiempo, marcándome retos que hicieran esforzarme cada día por ser mejor y siempre con tus lecciones de sabiduría que han servido de inspiración. A mi tutora **Pepita**, por su ayuda, comprensión y motivación durante todo este tiempo. A mis compañeros de grupo, **Àngel y Laura**, por vuestra ayuda todos estos años, parece que fue ayer cuando estábamos en el IMPPC y a **Roser**, bienvenida al grupo, suerte y ánimo en esta etapa que estás empezando. A **Jordi Juncà**, siempre dispuesto a prestarme su ayuda y su experiencia en hematología y

## AGRADECIMIENTOS

clínica. A **Marc Sorigué**, porque siempre resolvías mis consultas cuando te he pedido ayuda. A **Laia y Paula**, por vuestra dedicación al grupo y aportar aire fresco.

Gracias a l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras. Gracias al **Sr. Josep Carreras** y a todas las personas que forman parte de esta Fundación, y que se esfuerzan para que la leucemia y otras neoplasias hematológicas encuentren una cura. Gracias especialmente al **Prof. Evarist Feliu**, por abrirme las puertas y confiar en mí. A **Kiku**, por ser tan cercano, y tu disposición y apoyo al grupo. Gracias a todos, por hacer posible nuestras investigaciones.

Gracias a todo el equipo de Citometría del ICO. A **Sara y Minerva**, por todas las facilidades, paciencia y ayuda aun cuando estabais con mucho trabajo, y por vuestra amabilidad y simpatía. A **Marian**, por estar siempre dispuesta a ayudar y generar tan buen ambiente. A **Ester y Cristina**, por vuestra ayuda cuando la he necesitado. Así como, **Xavier, Laura, Mercè, Yolanda** y el resto de los profesionales del Core.

Gracias a las empresas de biotecnología que nos dan soporte. A todo el equipo de Sysmex, en especial a **Pepe**, por tu cercanía y apoyo durante todos estos años, y a **Marta** por tu amabilidad y positivismo. A **Mike y Jolene**, de Thermo Fisher, personalmente no nos hemos llegado a conocer, así y todo, siempre hemos podido contar con vuestra ayuda y vuestra tecnología en el laboratorio. *Thanks for your support, it's a real pleasure to work together!*

A todos los que hemos coincidido en alguna etapa durante nuestra trayectoria en el IJC. Gracias **Rocío y Paula**, con quien compartíamos laboratorio en un inicio. A **Nuri** por tu alegría, y **Francisco** por tu humor único. A nuestros compañeros de la tercera planta, por todas las comidas que hemos compartido. A **Jordi**, por tu optimismo, eres un soporte para todos y siempre podrás contar conmigo; a **Celia y Miriam**, mucho ánimo y fuerza que sois las siguientes. A **Eulalia, Joao, Mar, Jessi, Laura y Pame**, a **Natalia**, por tus visitas al laboratorio, a **Ana y Neus**, todas sois grandes científicas. **Josep**, por los buenos ratos.

A **Fumi y Miyako**, me acuerdo mucho de vuestras aportaciones, además de vuestras preguntas, siempre eran de ayuda y aprendía mucho. *Thank you for your good availability and interest!*

Gracias al laboratorio de Biología Molecular, en especial a **Lourdes, Itziar, y Diana**, siempre habéis sido muy buenas conmigo, y a **Pepe**, eres genial, siempre me sacabas

## AGRADECIMIENTOS

una risa. Gracias al laboratorio de Citogenética, a **Isabel y Javier**; así como el resto de los grandes profesionales que trabajáis en estos grupos.

Gracias a **Elisa Orna**, por resolver mis consultas y las tardes en el Navios, y a **Tomás Navarro**, por tu generosidad y empatía.

Gracias a **Albert y Alba**, por orientarme cuando iba a la *kitchen* y tantos correos por el nitrógeno.

Aunque hemos coincidido menos en el laboratorio, querría agradecer al resto de grupos del IJC. Así como, a todos los clínicos que están día a día en el tratamiento de pacientes, y dan soporte a la investigación.

A mis compañeros en el Hospital Sant Pau, donde di mis primeros pasos en el laboratorio y me motivaron para seguir en la investigación. Gracias a **Silvia Vidal**, por ser mi directora de máster, a **Juan y Carlos** por vuestra ayuda y motivación. A **M<sup>a</sup> Angels, Laura, Bet, Eder, German** y al resto del equipo.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a todos mis amigos quienes han influenciado en mi vida, que pese haber estado algo ausente os habéis mantenido.

Al Team V, mis amigos de la infancia, **Xiscu, Albert, Fer, Carlos y Egor**, tenemos muchas celebraciones pendientes, cumpleaños, navidades, barbacoas e incluso vendimiar.

A **Borja**, desde nuestros primeros pinitos en el gimnasio, que nos consideramos como hermanos.

A **Roger**, que siempre has estado ahí incondicionalmente desde que nos conocemos, así como tu nueva familia, **Marina** y el pequeño **Àngel**.

A mis grandes bioamigos, **Aleix, Antonio, Laura, Mónica, Neus y Pati**, con los que inicialmente sufrimos y sobrevivimos a la carrera, y uno de los motivos por los que haberme dedicado a la ciencia ha merecido la pena.

A mis compañeros de máster **Lidia, Manu y Laura**, buenos científicos y mejores personas.

A **Joaquín, Jordi y Diego** por vuestro soporte, amistad y compartir muchas horas de batallitas.



## LISTADO DE ABREVIACIONES

## LISTADO DE ABREVIACIONES

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**7-AAD** 7-Amino Actinomicina D, del inglés *7-Aminoactinomycin D*

**A** Área, del inglés *Area*

**AcMo** Anticuerpo Monoclonal

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ADP's** Fotodiodos de avalancha, del inglés *Avalanche Photodiodes*

**AF700** Alexa Fluor 700

**AIEOP** Asociación Italiana de Oncología Hematológica Pediátrica, del italiano *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica*

**ANOVA** Análisis de la Varianza, del inglés *ANalysis Of VAriance*

**APC** Alofocianina, del inglés *Allophycocyanin*

**APC-AF750** Alofocianina-Alexa Fluor 750, del inglés *Allophycocyanin-Alexa Fluor 750*

**APC-Cy7** Alofocianina Cianina 7, del inglés *Allophycocyanin Cyanine 7*

**APC-H7** Alofocianina-H7, del inglés *Allophycocyanin-H7*

**APC-R700** Alofocianina-R700, del inglés *Allophycocyanin-R700*

**APLS** *Alkaline Phosphatase Live Stain™*

**ASR** Reactivo específico de analito, del inglés *Analyte Specific Reagent*

**BCR** Receptor de Célula B, del inglés *B Cell Receptor*

**BFM** Berlin-Frankfurt-Münster

**BP** Paso de banda, del inglés *Bandpass*

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**CAR-T** Receptor de antígeno Quimérico de Célula T, del inglés *Chimeric Antigen Receptor T-Cell*

**CD** Cúmulo de Diferenciación, del inglés *Cluster of Differentiation*

**CE** Conformidad Europea, del francés *Conformité Européenne*

**CIE** Comisión Internacional de la Iluminación, del francés *Commission International d'Eclairage*

**CMYK** Cian Magenta Amarillo Negro, del inglés *Cyan Magenta Yellow Key*

**CO** Célula Objetivo

**COG** Grupo de Oncología Infantil, del inglés *Children's Oncology Group*

**CTCs** Células Tumorales Circulantes

**CV** Coeficiente de Variación

**DAPI** Diamidino-2-fenilindol, del inglés *diamidino-2-phenylindole*

**DCV** Tinción Vybrant® DyeCycle™ violeta, del inglés *Vybrant® DyeCycle™ Violet Stain*

**DPLP** Dicroico de paso largo, del inglés *Dichroic Longpass*

**DPSP** Dicroico de paso corto, del inglés *Dichroic Shortpass*

**DURA** *Dry Unitized Reagent Assay*

**ECD** *Energy Coupled Dye*

**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*

**EMA** Agencia Europea de Medicamentos, del inglés *European Medicines Agency*

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**ERIC** Iniciativa Europea de Investigación sobre Leucemia Linfocítica Crónica, del inglés *The European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia*

**ERM** Enfermedad Residual Medible

**EUSTM** Sociedad Europea para la Medicina Traslacional, del inglés *European Society for Translational Medicine*

**FA** Fosfatasa Alcalina

**FAG** Fosfatasa Alcalina Granulocitaria

**FBS** Suero Fetal Bovino, del inglés *Fetal Bovine Serum*

**FCS** Archivo estándar de citometría de flujo, del inglés *Flow Cytometry Standard file*

**FDA** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, del inglés *Food and Drug Administration*

**FH** Formaldehído, del inglés *Formaldehyde*

**FITC** Isocianato de Fluoresceína, del inglés *Fluorescein isothiocyanate*

**FlowCAP** Citometría de Flujo: Evaluación Crítica de los Métodos de Identificación de Poblaciones, del inglés *Flow Cytometry: Critical Assessment of Population Identification Methods*

**FRET** Transferencia de Energía de Resonancia de Förster, del inglés *Förster's Resonance Energy Transfer*

**FSC** Dispersión frontal, del inglés *Forward Scatter*

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**G-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*

**GCAP** Fosfatasa Alcalina de Célula Germinal, del inglés *Germ Cell Alkaline Phosphatase*

**GMP** Buenas prácticas de fabricación, del inglés *Good Manufacturing Practice*

**H** Altura, del inglés *Height*

**HBSS** *Hank's Balanced Salt Solution*

**HIP** Proyecto de Inmunología Humana, del inglés *Human Immunology Project*

**HIPC** Consorcio del Proyecto de Inmunología Humana, del inglés *The Human Immunology Project Consortium*

**HLA** Antígeno leucocitario humano, del inglés *Human Leukocyte Antigen*

**HSB** Matiz Saturación Brillo, del inglés *Hue Saturation Brightness*

**HSL** Matiz Saturación Luminosidad, del inglés *Hue Saturation Lightness*

**HUGTiP** Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

**IAP** Fosfatasa Alcalina Intestinal, del inglés *Intestinal Alkaline Phosphatase*

**IC** Intervalo de Confianza

**IFU** Instrucciones de uso, del inglés *Instructions For Use*

**ILT2** *Ig-Like Transcript 2*

**ISAC** Sociedad Internacional para el Avance de la Citometría, del inglés *International Society for Advancement of Cytometry*

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**ISHAGE** Sociedad Internacional de Hematología e Ingeniería del Injerto, del inglés *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*

**IVD** Diagnóstico *in vitro*, del inglés *In Vitro Diagnosis*

**LAL-T** Leucemia Aguda Linfoblástica de células T

**LAIP** Inmunofenotipo Asociado a la Leucemia, del inglés *Leukaemia Associated Immunophenotype*

**LIR1** Receptor de leucocitos tipo Ig, del inglés *Leukocyte Ig-Like Receptor*

**LP** Paso largo, del inglés *Longpass*

**Mdn** Mediana, del inglés *Median*

**MHz** Megahercio, del inglés *Megahertz*

**MIFlowCyt** Información Mínima sobre un Experimento de Citometría de Flujo, del inglés *Minimum Information about a Flow Cytometry Experiment*

**MPO** Mieloperoxidasa, del inglés *Myeloperoxidase*

**NCATS** Centro Nacional para el Avance de la Ciencia Traslacional, del inglés *National Center for Advancing Translational Science*

**NH<sub>4</sub>Cl** Cloruro de amonio

**NIH** Instituto Nacional de Salud, del inglés *National Institute of Health*

**NLNW** No Lisis No Lavado, del inglés *No-Lyse No-Wash*

**OMIP's** Paneles de Inmunofluorescencia Multicolor Optimizados, del inglés *Optimised Multicolor Immunofluorescence Panels*

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**PacB** *Pacific Blue™*

**PacO** *Pacific Orange™*

**PE** Ficoeritrina, del inglés *Phycoerythrin*

**PE-CF594** Ficoeritrina CF594, del inglés *Phycoerythrin CF594*

**PE-Cy5/PC5** Ficoeritrina Cianina 5, del inglés *Phycoerythrin-Cyanin 5*

**PE-Cy7/PC7** Ficoeritrina Cianina 7, del inglés *Phycoerythrin Cyanine 7*

**PE-DyLight594** Ficoeritrina DyLight594, del inglés *Phycoerythrin DyLight594*

**PerCP** Complejo de peridinina-clorofila, del inglés *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*

**PerCP-Cy5.5** Complejo de peridinina-clorofila Cianina 5.5, del inglés *Peridinin Chlorophyll Protein Complex Cyanine 5.5*

**PFH** Paraformaldehído, del inglés *Paraformaldehyde*

**Ph** Filadelfia, del inglés *Philadelphia*

**PLAP** Fosfatasa Alcalina Placentaria, del inglés *Placental Alkaline Phosphatase*

**PMT's** Tubos Fotomultiplicadores, del inglés *Photomultiplier Tubes*

**RCF** Fuerza Centrífuga Relativa, del inglés *Relative Centrifugal Force*

**RFC** Ruido de Fondo Completo

**RFP** Ruido de Fondo Parcial

**RGB** Rojo Verde Azul, del inglés *Red Green Blue*

**rSD** Desviación Típica robusta, del inglés *Robust Standard Deviation*

## LISTADO DE ABREVIACIONES

**RUO** Uso exclusivo en investigación, del inglés *Research Use Only*

**SC** Célula troncal, del inglés *Stem Cell*

**SIC** Sociedad Ibérica de Citometría

**SP** Paso corto, del inglés *Shortpass*

**SSC** Dispersión lateral, del inglés *Side Scatter*

**TIFF** Formato de Archivo de Imágenes con Etiquetas, del inglés *Tagged Image File Format*

**TNAP** Fosfatasa Alcalina no específica de Tejido, del inglés *Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase*

**TPH** Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

**TVAC** Verdadero Conteo Volumétrico Absoluto, del inglés *True Volumetric Absolute Counting*

**UK-NEQAS** Servicio Nacional de Evaluación de la Calidad Externa del Reino Unido, del inglés *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

**UV** Ultravioleta

**VCC** Citometría Capilar Volumétrica, del inglés *Volumetric Capillary Cytometry*

**VIH** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**W** Amplitud, del inglés *Width*

**WHO** Organización Mundial de la Salud, del inglés *World Health Organization*



# ÍNDICE



|   |    |
|---|----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....  | 9  |
| <b>LISTADO DE ABREVIACIONES</b> .....   | 15 |
| <b>ÍNDICE</b> .....   | 25 |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | 31 |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....   | 37 |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 41 |
| 1. La investigación traslacional y la citometría de flujo.....                          | 43 |
| 2. La citometría de flujo multiparamétrica .....  | 44 |
| 3. Aplicaciones y avances de la citometría de flujo.....                                | 46 |
| 3.1 Enfoque acústico .....  | 46 |
| 3.2 Sistemas volumétricos reales.....   | 48 |
| 3.3 Láser verde-amarillo en el recuento de células CD34+ .....                          | 49 |
| 3.4 Sondas y sustrato fluorogénico .....  | 50 |
| 3.5 Consensos metodológicos de la citometría de flujo.....                              | 50 |
| 3.5.1 Metodologías de mínima manipulación de la muestra .....                           | 54 |
| 4. Modelos de transferencia de la investigación básica a la clínica .....               | 55 |
| 4.1 Potencial de la transferencia de la citometría de flujo.....                        | 56 |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....  | 59 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | 63 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 67 |
| 1. Muestras biológicas.....   | 69 |
| 1.1 Pacientes y donantes sanos .....  | 69 |
| 2. Reactivos y equipamiento .....   | 71 |
| 2.1 Citómetro de flujo .....  | 71 |
| 2.2 Anticuerpos monoclonales y policlonales .....                                       | 71 |
| 2.3 Sondas vitales fluorescentes para ADN.....  | 71 |
| 2.4 Sustrato fluorogénico.....  | 72 |
| 2.5 Soluciones, medios y tampones .....   | 72 |
| 3. Instrumentación .....  | 73 |
| 3.1 Citometría de flujo .....   | 73 |
| 3.2 Inicialización de los citómetros de flujo .....                                     | 73 |
| 3.3 Configuración de filtros.....   | 75 |
| 3.3.1 Configuración de filtros del citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ ..... | 76 |

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.2 Configuración de filtros del citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT .....                                       | 76         |
| 3.3.3 Configuración de filtros del citómetro de flujo Navios™ EX .....  | 78         |
| 3.4 Adquisición de las muestras .....   | 79         |
| 3.5 Microscopía óptica .....  | 81         |
| 4. Procedimientos generales .....   | 82         |
| 4.1 Consideraciones previas a la realización de los experimentos .....  | 82         |
| 4.2 Discriminación de dobletes mediante fluorescencia .....   | 83         |
| 4.2.1 Protocolos de adquisición .....   | 83         |
| 4.2.2 Procesamiento de las muestras .....   | 85         |
| 4.2.3 Análisis de las muestras .....  | 86         |
| 4.3 Cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina por citometría de flujo .....   | 86         |
| 4.3.1 Protocolos de adquisición .....   | 86         |
| 4.3.2 Preparación de las muestras .....   | 88         |
| 4.3.3 Obtención de imágenes digitales de las extensiones de sangre .....  | 90         |
| 4.3.4 Análisis de las muestras .....  | 90         |
| 4.3.5 Análisis de intensidad de píxel .....   | 93         |
| 4.3.5.1 Análisis de imagen en 32-bits .....   | 93         |
| 4.3.5.2 Análisis de imagen en HSB .....   | 96         |
| 4.4 Cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+ mediante citometría de flujo volumétrica .....                           | 99         |
| 4.4.1 Protocolo de adquisición .....  | 100        |
| 4.4.2 Preparación de las muestras .....   | 102        |
| 4.4.3 Análisis de las muestras .....  | 102        |
| 4.5 Validación de reactivos para su uso en diagnóstico <i>in vitro</i> .....  | 103        |
| 4.5.1 Protocolos de adquisición .....   | 103        |
| 4.5.1.1 Anticuerpos leucocitarios de superficie e intracelulares .....  | 104        |
| 4.5.1.2 Anticuerpos antiplaquetarios .....  | 104        |
| 4.5.1.3 Cadenas Kappa y Lambda .....  | 105        |
| 4.5.2 Preparación de las muestras .....   | 106        |
| 4.5.2.1 Protocolo de marcaje de superficie .....  | 106        |
| 4.5.2.2 Protocolo de marcaje intracelular .....   | 107        |
| 4.5.2.3 Protocolo de marcaje de cadenas Kappa y Lambda .....  | 108        |
| 4.5.2.4 Protocolo de marcaje de plaquetas .....   | 108        |
| 4.5.3 Análisis de las muestras .....  | 109        |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>113</b> |
| <b>Estudio I: Comparación de la dispersión de la luz y la medición de la fluorescencia en la discriminación de dobletes</b> ..... | <b>115</b> |

|  |            |
|--|------------|
| Introducción Estudio I .....   | 117        |
| 1.1 Los dobletes y eventos coincidentes.....   | 119        |
| 1.2 Discriminación de los dobletes por los parámetros de dispersión de la luz.....   | 120        |
| 1.3 Discriminación de dobletes mediante fluorescencia: estudios de ciclo celular y ploidía.....  | 122        |
| 1.4 Factores críticos de la discriminación de dobletes mediante dispersión de la luz..   | 124        |
| Resultados Estudio I .....   | 127        |
| 2.1 Discriminación de dobletes: dispersión de la luz vs. fluorescencia .....   | 129        |
| 2.2 Discriminación de dobletes en productos con elevada celularidad .....  | 133        |
| 2.3 Eliminación de eventos coincidentes por hardware durante la adquisición.....   | 135        |
| 2.4 Discriminación de dobletes en los citómetros Attune™ y Attune™ NxT .....   | 138        |
| 2.6 Efecto de las soluciones de lisis de eritrocitos sobre las poblaciones leucocitarias   | 140        |
| <b>Estudio II: Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria mediante citometría de flujo .....</b>   | <b>143</b> |
| Introducción Estudio II .....  | 145        |
| 1.1 La Fosfatasa Alcalina granulocitaria .....   | 147        |
| 1.2 Utilidad clínica del índice de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria.....  | 147        |
| 1.3 Método citoquímico semicuantitativo de la actividad Fosfatasa Alcalina Granulocitaria.....   | 149        |
| 1.4 Aspectos críticos de la metodología citoquímica .....  | 151        |
| 1.5 Papel de la citometría de flujo en la cuantificación de la fosfatasa alcalina granulocitaria .....   | 152        |
| 1.6 Análisis digital de las imágenes de microscopía óptica de neutrófilos.....   | 152        |
| Resultados Estudio II .....  | 155        |
| 2.1 Comparación de la citometría de flujo y el método citoquímico sobre la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria .....                       | 157        |
| 2.2 Comparación del análisis digital y con el sistema de clasificación dependiente del observador .....  | 158        |
| 2.3 Efecto del uso de diferentes aumentos ópticos en el análisis digital de las imágenes .....   | 159        |
| 2.4 Ruido de fondo del análisis de imagen.....   | 160        |
| 2.5 Correlación del análisis de color HSB con la clasificación dependiente de observador .....   | 162        |
| 2.6 Comparación de los métodos citoquímico, de citometría de flujo y de análisis digital para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria ..... | 163        |
| <b>Estudio III: Cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+ mediante sistemas volumétricos .....</b>  | <b>165</b> |
| Introducción Estudio III .....   | 167        |
| 1.1 El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas .....  | 169        |
| 1.2 Sistemas de recuento de células CD34+ .....  | 171        |

|  |            |
|--|------------|
| 1.3 El fenómeno de la desaparición de las microesferas .....   | 172        |
| Resultados Estudio III .....   | 175        |
| 2.1 Recuento de células CD34+ mediante sistema de plataforma única y sistema volumétrico real .....              | 177        |
| 2.2 Efecto del fenómeno de desaparición de las microesferas en el recuento de células CD34+ .....                | 182        |
| <b>Estudio IV: Validación de anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos para el mercado CE-IVD .....</b> | <b>185</b> |
| Introducción Estudio IV .....  | 187        |
| 1.1 Clasificación regulatoria de reactivos: IVD, CE, ASR, RUO .....  | 189        |
| 1.2 Validación de reactivos para su utilización en el diagnóstico <i>in vitro</i> .....                          | 189        |
| 1.3 Selección de muestras patológicas.....   | 191        |
| 1.4 Variables en el inmunofenotipado .....   | 191        |
| 1.5 Estrategia de análisis .....   | 194        |
| 1.6 Criterios de aceptación de los reactivos.....  | 195        |
| Resultados Estudio IV .....  | 197        |
| 2.1 Fase I - II .....  | 199        |
| 2.2 Fase III .....   | 200        |
| 2.3 Fase IV .....  | 202        |
| 2.4 Fase V .....   | 203        |
| 2.5 Fase VI .....  | 206        |
| 2.6 Fase VII .....   | 208        |
| 2.7 Fase VIII .....  | 210        |
| 2.8 Compendio Fases I a VIII.....  | 214        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>   | <b>217</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>233</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>237</b> |
| <b>ANEXO I.....</b>  | <b>259</b> |
| 1. ARTÍCULO CIENTÍFICO ASOCIADO A LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL .....  | 261        |
| 2. OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN LA ETAPA DE LA TESIS DOCTORAL .....                                 | 261        |
| 3. COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES Y NACIONALES DE LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL .....           | 262        |
| 4. COMUNICACIÓN DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA.....   | 264        |
| <b>ANEXO II.....</b>   | <b>265</b> |
| ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO IV .....  | 267        |

## ÍNDICE DE FIGURAS



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Enfoque hidrodinámico y enfoque hidrodinámico asistido por enfoque acústico .....  | 47  |
| <b>Figura 2.</b> Control diario del citómetro Navios™ EX .....  | 74  |
| <b>Figura 3.</b> Tipos de filtros de citómetros de flujo .....  | 75  |
| <b>Figura 4.</b> Disposición de filtros del kit de filtros Invitrogen™ Attune™ No-Lyse No-Wash Filter Kit .....                                   | 77  |
| <b>Figura 5.</b> Configuración de los filtros ópticos utilizados en el citómetro de flujo Navios™ EX....  | 78  |
| <b>Figura 6.</b> Discriminación de dobletes en el citómetro Attune™ NxT .....   | 83  |
| <b>Figura 7.</b> Discriminación de dobletes en el citómetro Attune™ .....   | 84  |
| <b>Figura 8.</b> Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina en el citómetro Attune™ .....   | 87  |
| <b>Figura 9.</b> Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina en el citómetro Attune™ NxT .....   | 88  |
| <b>Figura 10.</b> <i>Density plot</i> de la intensidad de fluorescencia de la actividad fosfatasa alcalina (APLS-H) .....                         | 92  |
| <b>Figura 11.</b> Fórmula para determinar el índice de APLS por citometría de flujo .....   | 92  |
| <b>Figura 12.</b> Procesamiento de las imágenes según la escala de grises (32-bits) .....   | 94  |
| <b>Figura 13.</b> Fórmula del análisis digital utilizando la escala de grises (32-bits) .....   | 96  |
| <b>Figura 14.</b> Análisis de imagen 32-bits y HSB.....   | 97  |
| <b>Figura 15.</b> Procesamiento de las imágenes según el modelo de color HSB .....  | 98  |
| <b>Figura 16.</b> Fórmula del análisis digital utilizando el modelo de color HSB.....   | 99  |
| <b>Figura 17.</b> Panel de adquisición para cuantificar las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ en el citómetro de flujo Attune™ NxT ..... | 101 |
| <b>Figura 18.</b> Plaquetas, leucocitos y eritrocitos según los parámetros de dispersión de la luz ...  | 105 |
| <b>Figura 19.</b> Estrategia de análisis para la validación del anticuerpo CD34 .....   | 111 |
| <b>Figura 20.</b> Esquema representativo de los parámetros del pulso en la detección de una célula única y de un doblete.....                     | 121 |
| <b>Figura 21.</b> Discriminación de dobletes en una muestra con células 2N, 4N, 6N y 8N.....  | 122 |
| <b>Figura 22.</b> Fenómeno de trogocitosis .....  | 124 |
| <b>Figura 23.</b> Relación entre la división celular y la transición a propiedades modificadas de la FSC .....                                    | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 24.</b> Discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz y fluorescencia .....  | 129 |
| <b>Figura 25.</b> Contribución de los eritrocitos en el parámetro Área del pulso de la dispersión de la luz en muestras no lisadas y adquiridas a alta velocidad ..... | 131 |
| <b>Figura 26.</b> Gráficos Bland-Altman: discriminación de dobletes por fluorescencia y dispersión de la luz .....   | 132 |
| <b>Figura 27.</b> Gráficos Bland-Altman: discriminación de dobletes en diferentes condiciones experimentales .....   | 133 |
| <b>Figura 28.</b> Discriminación de dobletes en una muestra con elevada celularidad .....  | 134 |
| <b>Figura 29.</b> Discriminación de dobletes en una muestra de sangre periférica movilizada para el recuento de células CD34+ .....                                    | 135 |
| <b>Figura 30.</b> Discriminación de dobletes excluyendo los eventos coincidentes y sin excluirlos ..   | 136 |
| <b>Figura 31.</b> Gráficos Bland-Altman: concentración celular obtenidas en los citómetros Attune™ y Attune™ NxT .....   | 139 |
| <b>Figura 32.</b> Regresión lineal: discriminación de dobletes por fluorescencia en muestras lisadas y sin lisar .....   | 141 |
| <b>Figura 33.</b> Principales hemopatías en las que se aplica la prueba de la fosfatasa alcalina granulocitaria .....  | 149 |
| <b>Figura 34.</b> Clasificación de la actividad de fosfatasa alcalina granulocitaria por el método citológico .....  | 150 |
| <b>Figura 35.</b> Clasificación de la actividad de fosfatasa alcalina granulocitaria en 4 niveles.....   | 151 |
| <b>Figura 36.</b> Comparación de los valores de la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria con el método citológico y por citometría de flujo .....          | 157 |
| <b>Figura 37.</b> Gráfico Bland-Altman: actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria .....  | 158 |
| <b>Figura 38.</b> Clasificación de la intensidad del citoplasma de neutrófilos medida con el análisis de imagen en 32-bits.....  | 159 |
| <b>Figura 39.</b> Gráficos Bland-Altman: análisis de imágenes a 500 y 1000 aumentos .....  | 160 |
| <b>Figura 40.</b> Regresión lineal: ruido de fondo de las imágenes de microscopía óptica .....   | 161 |
| <b>Figura 41.</b> Gráfico Bland-Altman: ruido de fondo de las imágenes de microscopía óptica .....   | 161 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 42.</b> Clasificación de la intensidad del citoplasma de neutrófilos medida con el análisis de imagen en HSB .....  | 163 |
| <b>Figura 43.</b> Índices de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria obtenidos por el método citoquímico, los métodos de análisis digital y citometría de flujo .....                       | 164 |
| <b>Figura 44.</b> Regresión lineal: sistema volumétrico de microesferas y sistema volumétrico real en el Attune™ NxT.....   | 177 |
| <b>Figura 45.</b> Gráficos Bland-Altman: sistema volumétrico de microesferas y sistema volumétrico real en el Attune™ NxT.....  | 178 |
| <b>Figura 46.</b> Regresión lineal: sistema volumétrico de microesferas en el Cytomics FC500™ y sistema volumétrico real en el Attune™ NxT .....  | 179 |
| <b>Figura 47.</b> Gráficos Bland-Altman: sistema volumétrico de microesferas en el Cytomics FC500™ y sistema volumétrico real en el Attune™ NxT .....   | 180 |
| <b>Figura 48.</b> Regresión lineal: sistema volumétrico de microesferas en el Cytomics FC500™ y en el Attune™ NxT .....   | 181 |
| <b>Figura 49.</b> Gráficos Bland-Altman: sistema volumétrico de microesferas en el Cytomics FC500™ y en el Attune™ NxT .....  | 182 |
| <b>Figura 50.</b> Recuento de células CD34+ en el Attune™ NxT según el sistema volumétrico de microesferas y sistema volumétrico real .....   | 183 |
| <b>Figura 51.</b> Recuento de 0 a 20 células CD34+ en el Attune™ NxT según el sistema de microesferas y volumétrico real.....   | 184 |
| <b>Figura 52.</b> Patrones de marcaje del anticuerpo CD38 producido por dos clones diferentes (HB7 y HIT2) .....  | 193 |
| <b>Figura 53.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 23 anticuerpos de las Fases I y II..... | 200 |
| <b>Figura 54.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 22 anticuerpos de la Fase III .....     | 201 |
| <b>Figura 55.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 18 anticuerpos de la Fase IV .....      | 203 |
| <b>Figura 56.</b> Análisis para identificar las células CD117+ .....  | 204 |
| <b>Figura 57.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 17 anticuerpos de la Fase V .....       | 206 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 58.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 23 anticuerpos de la Fase VI .....   | 208 |
| <b>Figura 59.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 18 anticuerpos de la Fase VII .....  | 210 |
| <b>Figura 60.</b> Pruebas para la validación del anticuerpo CD11b FITC.....  | 212 |
| <b>Figura 61.</b> Representación gráfica de la $\Delta\%$ de células objetivo obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia en los 18 anticuerpos de la Fase VIII .....   | 214 |
| <b>Figura 62.</b> Distribución de la $\Delta\%$ de las células objetivo entre el anticuerpo de referencia y al anticuerpo para validar, sobre el porcentaje de células objetivo del anticuerpo de referencia en los 134 anticuerpos certificados para CE-IVD ..... | 215 |

## ÍNDICE DE TABLAS



|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Lista de los fluorocromos, fuente de excitación, longitudes de onda de excitación y emisión, y detector donde se recogieron sus fluorescencias ..... | 79  |
| <b>Tabla 2.</b> Valores del análisis de imagen de 32-bits, incluyendo y excluyendo el núcleo de las células del análisis .....                                       | 95  |
| <b>Tabla 3.</b> Anticuerpos validados para su uso en IVD en cada fase del estudio.....   | 199 |
| <b>Tabla 4.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 23 anticuerpos de las Fases I y II .....               | 199 |
| <b>Tabla 5.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 22 anticuerpos de la Fase III.....                     | 200 |
| <b>Tabla 6.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase IV .....                     | 202 |
| <b>Tabla 7.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 17 anticuerpos de la Fase V .....                      | 205 |
| <b>Tabla 8.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 23 anticuerpos de la Fase VI .....                     | 207 |
| <b>Tabla 9.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase VII .....                    | 209 |
| <b>Tabla 10.</b> Diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo en las muestras probadas con los 13 anticuerpos de la Fase VIII .....                  | 213 |



# INTRODUCCIÓN



## 1. La investigación traslacional y la citometría de flujo

El concepto de investigación traslacional se puede entender como el proceso que implica la integración multidisciplinaria entre la investigación básica, clínica, aplicada, poblacional y de medicina basada en la evidencia, con el objetivo de acelerar los descubrimientos científicos con el consecuente efecto sobre el beneficio de los pacientes y la sociedad<sup>1-3</sup>. Si bien existen múltiples definiciones, no se ha alcanzado un consenso exacto de definición de investigación traslacional<sup>4-8</sup>.

En las últimas décadas, la importancia de la investigación traslacional ha ido en aumento. El Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH), creó en 2005 el programa *Clinical and Translational Science Awards*<sup>9</sup> para fomentar la investigación traslacional. Esta misma institución propuso en 2007 una definición según la cual la investigación traslacional comprende dos áreas. La primera área incluye el proceso de aplicar los descubrimientos generados durante la investigación en el laboratorio y los estudios preclínicos y, por otra parte, el desarrollo de ensayos y estudios en humanos. La segunda área hace referencia a la investigación destinada a adoptar las mejores prácticas en la comunidad, destacando la importancia de la rentabilidad en las estrategias de prevención y tratamiento<sup>10</sup>.

La citometría de flujo es una tecnología ampliamente aplicada en investigación traslacional<sup>11-13</sup>. Por ejemplo, la medicina personalizada para el tratamiento del cáncer hematológico con el desarrollo de los Receptores de antígeno Quimérico de Célula T (CAR-T)<sup>14,15</sup> se incluiría en la primera área, mientras que el desarrollo de nuevos paneles para la detección de subtipos de poblaciones celulares<sup>16,17</sup> se incluiría en la segunda.

## 2. La citometría de flujo multiparamétrica

La citometría de flujo comprende la medición de eventos suspendidos generalmente en una fase fluídica<sup>18</sup>. Esta tecnología permite analizar a alta velocidad un gran número de eventos respecto a la dispersión de la luz y de la fluorescencia.

El citómetro de flujo consiste del sistema fluídico, el sistema óptico y el sistema electrónico<sup>19</sup>.

El **sistema fluídico** es el sistema encargado de direccionar células y partículas en suspensión hasta el punto de interrogación o punto de intersección con el haz del láser o láseres del citómetro. El sistema fluídico permite conseguir un efecto de enfoque hidrodinámico. Este enfoque se produce cuando dos corrientes de fluido con diferente caudal de flujo volumétrico y presión, de forma paralela, mantienen un flujo laminar, evitando la mezcla del fluido acompañante y la suspensión de partículas, células y otros componentes de la muestra. Al llegar al punto de interrogación, la corriente de fluido se va estrechando con la finalidad de conseguir que las células y partículas queden alineadas en una sola fila, e idealmente de una en una<sup>20</sup>.

El **sistema óptico** está compuesto por la fuente de luz, generalmente láser, y el conjunto de filtros y espejos que permiten seleccionar las diferentes longitudes de onda y recogerlas mediante detectores<sup>19</sup>. En unos inicios dichos láseres eran de ion-argón, ion-kriptón y helio-neón. Estos fueron progresivamente sustituidos por láseres de diodos emisores de luz o LED (*Light Emitting Diode*) permitiendo reducir el tamaño de los equipos, ser más eficientes energéticamente y económicos de producir. Y posteriormente, junto con los láseres de estado sólido y los láseres DPSS (*Diode-Pumped Solid-State*), incrementando las longitudes de onda del espectro visible que pueden ser exploradas en citometría de flujo y, por lo tanto, incrementando el número total de parámetros que pueden ser analizados simultáneamente<sup>19,21,22</sup>.

El **sistema electrónico** comprende desde los detectores hasta el sistema informático. En los detectores se captan los fotones provenientes del sistema óptico y se convierten en electrones. Esta señal de electrones es amplificada y convertida en un pulso de voltaje que se caracteriza por sus parámetros de altura, amplitud y área. Seguidamente,

mediante un conversor analógico-digital, se convierte la señal analógica (voltaje) a un valor binario (bits) que puede ser procesado por el sistema informático para su análisis y almacenamiento<sup>23</sup>. Los detectores son en su mayoría fotodiodos y fotomultiplicadores. Los fotodiodos son utilizados para detectar las señales de mayor intensidad, como la dispersión frontal de la luz, la cual se asocia al tamaño de las partículas analizadas y se detecta en el canal de la dispersión frontal (FSC, *Forward Scatter*). Los fotomultiplicadores (PMT's, *Photomultiplier Tubes*) en cambio, se utilizan para detectar señales de menor intensidad como las fluorescencias y la dispersión lateral de la luz (SSC, *Side Scatter*), asociada a la complejidad celular. También existen los fotodiodos de avalancha (ADP's, *Avalanche Photodiodes*), que son fotodetectores con una mayor eficiencia cuántica que permiten convertir longitudes de onda desde los 400 nm hasta los 1100 nm, mientras que los PMT's convierten longitudes de onda de hasta 800 nm<sup>24</sup>. Otros componentes relevantes son los filtros de densidad neutra, los cuales se utilizan para atenuar la luz sin discriminar longitudes de onda, siendo ubicados normalmente en frente del detector de la dispersión frontal de la luz, aunque también en otros detectores<sup>19</sup>. Y, la barra de obscuración, utilizada para bloquear señales que puedan saturar el detector<sup>19</sup>. También cabe mencionar la detección de la dispersión de la luz en diferentes ángulos (FSC 5° - 50°; SSC 50° - 130°) en lugar de la configuración convencional (FSC 0° - 5°; SSC 85° - 95°), permitiendo diferenciar distribuciones densas y dispersas de orgánulos dentro de una célula sin utilizar marcajes<sup>25</sup>.

### 3. Aplicaciones y avances de la citometría de flujo

Una de las primeras aplicaciones clínicas de la citometría de flujo fue la detección de aneuploidías y la medición de la distribución del ciclo celular<sup>26</sup>. Posteriormente la citometría de flujo se aplicó en diversas disciplinas como la hematología<sup>27</sup>, inmunología<sup>28</sup>, oncología<sup>29,30</sup>, virología<sup>31</sup>, biología molecular<sup>32</sup>, y microbiología<sup>33</sup>.

Además de en investigación básica, la citometría de flujo también se utiliza en la práctica clínica habitual<sup>13,34</sup>, para el diagnóstico y clasificación de diferentes enfermedades hematológicas<sup>35</sup> y autoinmunes<sup>36</sup>. También es de gran importancia en el estudio de la enfermedad residual medible (ERM)<sup>37</sup>, para el recuento de linfocitos CD4+ en pacientes con VIH<sup>38</sup> o de la eritroblastosis fetal<sup>39</sup>. Asimismo, también se emplea para la detección de eventos minoritarios, como pueden ser las células tumorales circulantes (CTC's) en sangre periférica<sup>40</sup>, el recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+<sup>41,42</sup>, la identificación del inmunofenotipo asociado a la leucemia (LAIP, *Leukaemia Associated Immunophenotypes*) del paciente en el momento del diagnóstico para su posterior identificación en los controles de seguimiento del paciente, entre otras aplicaciones<sup>43</sup>.

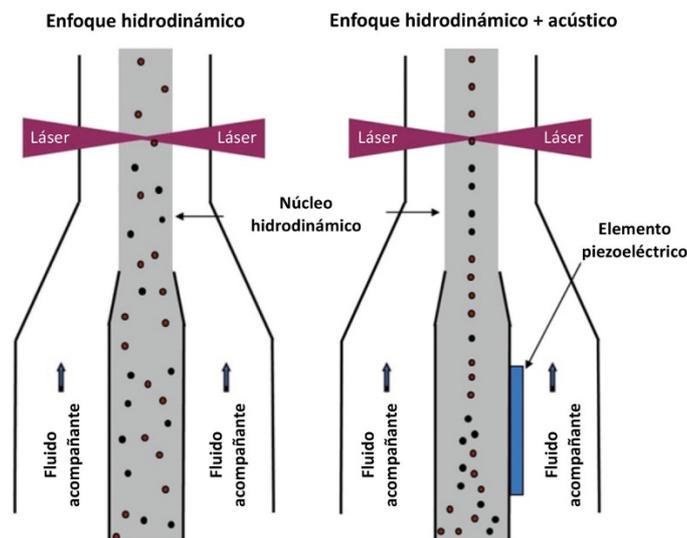
Paralelamente al progreso de las aplicaciones de la citometría de flujo, se desarrollaron avances tecnológicos y metodológicos, de los cuales, debido al desarrollo de esta Tesis, destacan el enfoque acústico, los sistemas volumétricos reales, el láser verde-amarillo, las sondas y sustratos fluorogénicos y los consensos metodológicos en la citometría de flujo.

#### 3.1 Enfoque acústico

El **enfoque hidrodinámico asistido por enfoque acústico** permite mejorar el enfoque hidrodinámico alineando los eventos en el punto de interrogación mediante ondas acústicas de frecuencias superiores a 1 Mhz, emitidas por un elemento piezoeléctrico. Para ello, aprovecha las diferencias físicas entre las células o partículas de la suspensión en relación con el fluido acompañante, mediante el efecto de la radiación acústica, descrito inicialmente por Kundt y Lehman<sup>44</sup>. La idea original del enfoque acústico para

poder alinear las células mediante ondas sonoras fue desarrollada en 2005 por Greg Kaduchak y Gregory Goddard<sup>45</sup>, así como la primera aplicación en citometría de flujo<sup>46</sup>.

En citometría de flujo, la tasa de eventos depende de la concentración de la muestra y la velocidad de flujo, por lo que, para aumentar la tasa de eventos durante la adquisición, se incrementa la velocidad de flujo. En el modelo hidrodinámico, el aumento de la velocidad de adquisición afecta negativamente a la precisión y exactitud de la medición, como consecuencia de la pérdida de laminaridad (régimen turbulento). A diferencia de este, el enfoque acústico puede mantener un análisis preciso a mayores tasas de eventos (**Figura 1**)<sup>47</sup>. Además, permite utilizar capilares de mayor diámetro, minimizando el riesgo de obstrucciones<sup>18</sup>. El enfoque acústico, además, permite una mejor identificación de poblaciones minoritarias, por reducción de la coincidencia<sup>47</sup>.



**Figura 1.** Enfoque hidrodinámico y enfoque hidrodinámico asistido por enfoque acústico. (Imagen adaptada de *Fundamentals of acoustic cytometry*)<sup>47</sup>.

Es importante aclarar que el enfoque acústico no afecta a la viabilidad celular. La lisis celular por ultrasonidos utiliza frecuencias de sub-megaherzios<sup>48</sup> que pueden desencadenar el fenómeno de cavitación<sup>49</sup>. Este es un fenómeno por el que se forman diminutas burbujas, las cuales implosionan, produciendo la lisis celular. Los elementos piezoeléctricos utilizan frecuencias superiores a 1 MHz, evitando este fenómeno<sup>50</sup>. Además, en el enfoque hidrodinámico asistido por enfoque acústico, las células y/o partículas permanecen expuestas a estas frecuencias durante un lapso extremadamente

corto de tiempo<sup>47</sup>, no viéndose afectadas negativamente por el campo acústico, tal y como demostraron Goddard y colaboradores<sup>50</sup>.

### 3.2 Sistemas volumétricos reales

Los sistemas volumétricos permiten obtener la concentración celular de las muestras adquiridas. El sistema volumétrico más extendido se basa en la utilización de microesferas de concentración conocida<sup>42,51</sup>. Dichas microesferas se añaden durante la preparación de la muestra en una concentración conocida sobre un volumen total predeterminado. Los denominados **sistemas volumétricos reales** no requieren de microesferas para obtener el dato de la concentración celular de la muestra.

El origen de los sistemas de cuantificación volumétrica real se remonta a 1990 con el ORTHO Cytoron Absolute junto con el programa informático Immunocount II<sup>®52</sup>. Fue el primer citómetro de flujo con capacidad de realizar la cuantificación real de células, para lo cual, utilizaba una bomba volumétrica de precisión para aspirar y dispensar la muestra.

Posteriormente, diferentes fabricantes de citómetros de flujo desarrollaron otros sistemas volumétricos reales.

Partec GmbH desarrolló el sistema **TVAC**<sup>53</sup> (*True Volumetric Absolute Counting*), basado en la cuantificación de los eventos adquiridos en un volumen comprendido entre dos electrodos, correspondiente a 200 µL.

Becton Dickinson desarrolló un sistema de bombas peristálticas para determinar el volumen de la muestra y enumerar directamente las células. Este sistema volumétrico requería realizar calibraciones periódicas, por lo que desarrollaron el dispositivo **BD Flow Sensor**<sup>54</sup>. Este sensor, equipado en el citómetro de flujo BD FACSVerse™ permite medir el volumen de la muestra a medida que es adquirida. A pesar de ello, a final del año 2019, el citómetro BD FACSVerse™ junto con los dispositivos asociados como el BD Flow Sensor fueron discontinuados<sup>55</sup>.

Beckman Coulter también desarrolló un equipo de cuantificación volumétrica denominado AQUIOS CL. Este equipo se basó en el sistema **Volumetric Capillary**

**Cytometry** (VCC) el cual emplea un sistema de detección de fluorescencia mediante escaneo de diferentes tramos de la muestra distribuida a lo largo de un capilar de vidrio<sup>56,57</sup>.

Y, Thermo Fisher™ desarrolló el citómetro de flujo Attune™, el Attune™ NxT y Attune™ CytPix. Estos citómetros de flujo cuentan con un **sistema de recuento volumétrico real** basado en tres fundamentos: (1) jeringas volumétricas<sup>58</sup> que permiten dispensar un volumen exacto de muestra durante la adquisición; (2) bombas no peristálticas para que la dispensación de la muestra se realice de manera continua y lineal; y (3) un soporte informático adaptado al citómetro de flujo que muestra el volumen y la velocidad a la que se dispensa la muestra, así como la concentración de los eventos adquiridos en tiempo real.

### **3.3 Láser verde-amarillo en el recuento de células CD34+**

El método más extensamente utilizado para cuantificar células progenitoras hematopoyéticas CD34+ es el recomendado por la **ISHAGE** (*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*)<sup>42</sup>. En dicho método se recomienda el uso de los anticuerpos CD34 PE y CD45 FITC y su excitación con el láser azul (488 nm). El fluorocromo PE tiene dos picos de absorción: un pico de absorción máxima en 565 nm y un segundo pico de absorción en 496 nm. Esta característica de la PE resulta especialmente relevante para la cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+, pues la excitación de la PE con el láser verde-amarillo permite resolver mejor las poblaciones CD34+ y, a su vez evitar problemas derivados de la superposición de los espectros entre PE y FITC cuando ambos son excitados a 488 nm<sup>59</sup>. Además, la excitación de la PE con el láser verde-amarillo permite incrementar en aproximadamente cuatro veces el valor del índice de tinción<sup>59</sup>.

### 3.4 Sondas y sustrato fluorogénico

En esta Tesis destacan la sonda **DCV** (*DyeCycle™ Violet*) y el sustrato **APLS**. DCV es una sonda permeable, no tóxica y fluorogénica al unirse a la doble cadena de ADN (ThermoFisher™)<sup>60</sup>. Se excita en 405 nm y presenta una emisión máxima en 437 nm.

**APLS** es un sustrato para la fosfatasa alcalina (FA) permeable a la membrana celular y no tóxico para la célula. Además, es fluorogénico, emitiendo fluorescencia una vez ha sido hidrolizado por la FA<sup>61,62</sup>. Este sustrato fue desarrollado originalmente para su uso en microscopía de fluorescencia<sup>61</sup> y posteriormente su uso fue adaptado para su aplicación en citometría de flujo<sup>62</sup>.

### 3.5 Consensos metodológicos de la citometría de flujo

Además de los avances tecnológicos de la citometría de flujo, también son importantes los avances en el consenso metodológico y estandarización de los procesos y análisis en la citometría de flujo.

Para ello, una primera parte fundamental es la comunicación y difusión de los avances científicos, destacando los estándares de publicación científica como el **MIFlowCyt** (*Minimum Information about a Flow Cytometry Experiment*) publicado en 2008 en *Cytometry Part A*<sup>63</sup>. Como su propio nombre indica, es un estándar sobre la información mínima que deben incluir los estudios de citometría de flujo, de manera que se elimine la ambigüedad de la interpretación de los descubrimientos experimentales descritos. La información mínima que se debe incluir según MIFlowCyt es la descripción de los especímenes y reactivos utilizados, la configuración del equipo incluyendo los detalles de este, como los filtros ópticos utilizados y el voltaje de los detectores y, el procesamiento de datos utilizado para interpretar los datos obtenidos incluyendo los archivos de datos, los detalles de compensación, los detalles de la transformación de los datos y de las ventanas. Para desarrollar este estándar se creó un grupo multidisciplinar que incluía bioinformáticos, estadísticos computacionales, desarrolladores de programas informáticos, fabricantes de equipos e investigadores básicos y clínicos.

Otro formato de publicación es el de **Paneles de Inmunofluorescencia Multicolor Optimizados** (OMIP's, *Optimised Multicolor Immunofluorescence Panels*) perteneciente también a *Cytometry Part A*<sup>64</sup>. La idea de desarrollar estos OMIP's se debió al incremento del número parámetros que son capaces de detectar los citómetros de flujo. Estos paneles son de gran utilidad para otros laboratorios de investigación, contribuyendo a reducir en gran medida el proceso de optimización, así como los costes derivados en su elaboración<sup>64</sup>. Por ejemplo, el OMIP 069 es un panel de 40 colores que permite realizar simultáneamente el inmunofenotipo de las principales subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica<sup>65</sup>.

En 2019 también la revista *Cytometry Part A* introdujo un nuevo formato de publicación denominado **Phenotype Reports**<sup>66</sup> el cual está diseñado para facilitar la identificación fenotípica, principalmente en humanos, otros primates y roedores. Este formato incluye entre otras informaciones, el listado de los marcadores aceptados para su identificación, la justificación en la elección de los clones y conjugados, las estrategias de análisis, y la descripción del clon que proporciona la mejor reactividad<sup>66,67</sup>.

Resulta de gran interés la capacidad de implementación de los paneles de anticuerpos desarrollados por diversos consorcios, así como kits de reactivos que se explican a continuación, e incluso el desarrollo e implementación de las nuevas tecnologías de Machine Learning<sup>68</sup> para el análisis de subpoblaciones, como el proyecto FlowCAP (*Flow Cytometry: Critical Assessment of Population Identification Methods*)<sup>69</sup>.

La segunda parte fundamental para el avance en el consenso metodológico y estandarización de los procesos y análisis, es precisamente alcanzar dichos consensos acerca de los marcadores específicos para la realización de paneles, la elección de conjugados y, el procesamiento de las muestras<sup>70,71</sup>.

Con estos objetivos se han creado diversos consorcios a nivel internacional como son el ERIC (*The European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia*)<sup>72</sup>, EuroFlow<sup>73</sup>, France Flow, el HIPC (*The Human Immunology Project Consortium*)<sup>74</sup>, Harmonemia<sup>75</sup>, el *The ONE Study*<sup>76</sup> y, los grupos COG (*Children's Oncology Group*)<sup>77</sup>, AIEOP (*Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica*)<sup>78</sup> y BFM (*Berlin-Frankfurt-Munster*)<sup>79</sup>.

El **consorcio europeo ERIC** se fundó en el año 2001 con el objetivo de desarrollar paneles de anticuerpos para la detección de la ERM en la leucemia linfocítica crónica. En 2007 publicó un panel de 4 colores<sup>80</sup> con una precisión del 97% incluyendo la combinación de anticuerpos CD5/CD19 con CD20/CD38, CD81/CD22 y CD79b/CD43. Posteriormente, en 2013, se actualizó a un panel de 6 colores con el que mejoraron la sensibilidad<sup>72</sup> y, en 2016 presentaron otra aproximación con los anticuerpos CD5, CD19, CD20, CD43, CD79b y CD81<sup>81</sup>, complementaria con el método de inmunosecuenciación ClonoSEQ®.

El consorcio **EuroFlow** está formado por 20 grupos de estandarización diagnóstica, cuyas actividades comenzaron oficialmente en 2006 como un proyecto de investigación con objetivos específicos, dentro del programa FP6-2004-LIFESCIHEALTH-5 de la Comisión Europea<sup>17,70,73,82,83</sup>. Este consorcio tiene como principal objetivo el desarrollo y estandarización de pruebas de citometría de flujo que faciliten la realización del diagnóstico, pronóstico, subclasificación de las enfermedades hematológicas y seguimiento del efecto del tratamiento del paciente<sup>84</sup>. Cytognos, S. L., miembro del consorcio EuroFlow, desarrolló el programa de análisis informático Infinicyt™, con la finalidad de integrar los datos y ayudar a interpretar nuevos casos<sup>85</sup>.

En el año 2010 se creó el grupo **FranceFlow**, originalmente formado por 15 entidades clínicas, con la finalidad de transferir a los centros franceses asociados, los protocolos desarrollados por el consorcio EuroFlow, así como para organizar los controles de calidad y evaluar la viabilidad de su aplicación<sup>86</sup>.

En el caso del **Human Immunology Project Consortium (HIPC)**, impulsado en 2010 por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos, el objetivo fue el desarrollo de pruebas estandarizadas para inmunofenotipar individuos sanos y poder identificar los cambios inmunológicos que se presentan en las patologías. Posteriormente en 2012 con dicho objetivo, además de para minimizar las variables en los ensayos de inmunofenotipo, propusieron un conjunto de paneles de 8 colores con marcadores de superficie para identificar las células T, T reguladoras, los subtipos Th1, Th2 y Th17, las células B, células dendríticas, monocitos y células NK<sup>74</sup>.

El proyecto **Harmonemia**<sup>75</sup> fue impulsado por la *European LeukemiaNet* con el objetivo de desarrollar un método simple, rápido y robusto para obtener datos comparables

entre diferentes equipos de citometría de flujo a nivel internacional y, lograr obtener resultados con la misma calidad que el EuroFlow.

Con un enfoque similar, el consorcio **The ONE Study**<sup>76</sup>, formado por ocho instituciones académicas y cinco compañías de Europa y Estados Unidos, busca desarrollar una estrategia para estudiar los efectos de las terapias destinadas a modular la respuesta inmunitaria y comparar la efectividad del trasplante de órganos, de modo que se puedan detectar los cambios de la mayoría de las subpoblaciones leucocitarias en sangre. Para ello iniciaron una serie de ensayos clínicos con la finalidad de aplicar diferentes terapias celulares destinadas a promover la tolerancia a los trasplantes renales, de manera que no fuese necesario el tratamiento de inmunosupresión a largo plazo. También publicaron en 2016<sup>87</sup> las estrategias y pautas que siguieron.

También cabe destacar el **grupo COG**, la organización más grande a nivel mundial dedicada exclusivamente a la investigación del cáncer en niños y adolescentes. Y los **grupos europeos AIEOP y BFM**, los cuales están enfocados en la detección de la ERM de la Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores B, la leucemia más común en niños y adultos jóvenes<sup>88</sup>, presentando en 2016 las guías para realizar el inmunofenotipo de la Leucemia Linfoblástica Aguda pediátrica<sup>89</sup>.

También los fabricantes de citómetros han desarrollado sus propios sistemas para estandarizar las pruebas de inmunofenotipo. Por ejemplo, a partir de la **tecnología DURA (Dry Unitized Reagent Assay)** desarrollada originalmente por Raghavendra y colaboradores<sup>90</sup>. Esta tecnología permite disponer de tubos con las combinaciones de anticuerpos deshidratados y preparados para ser utilizados añadiendo directamente la muestra. Mediante esta tecnología, Beckman Coulter en colaboración con *The One Study*, desarrollaron los paneles DURAClone<sup>91,92</sup>. Estos incluyen combinaciones de anticuerpos preformulados para realizar estudios de cuantificación celular, determinación de viabilidad celular y, determinación de diversas subpoblaciones leucocitarias entre otros. Y a partir de esta tecnología, también desarrollaron los kits ClearLLab<sup>71,93</sup>, para el diagnóstico específico de leucemias y linfomas.

### 3.5.1 Metodologías de mínima manipulación de la muestra

Las metodologías de mínima manipulación de la muestra son fundamentales para estudiar las células en su estado nativo y combinar ensayos de inmunofenotipo con ensayos funcionales sobre las células vivas<sup>94</sup>. Además, simplifican y agilizan la preparación de la muestra. Estas metodologías se remontan a 1964<sup>95</sup> con el uso de naranja de acridina para marcar células nucleadas y discriminarlas sobre los eritrocitos mediante fluorescencia.

Con los métodos de mínima manipulación de la muestra se discriminan los eritrocitos del resto de las poblaciones celulares utilizando el uso de marcadores expresados por eritrocitos, leucocitos o, células nucleadas y, explorando las diferencias en la dispersión de la luz entre eritrocitos y leucocitos.

En el primer caso se utilizarían, por ejemplo, marcadores fenotípicos como la Glicoforina A, expresada en los eritrocitos<sup>96</sup> y el marcador CD45 expresado en los leucocitos<sup>97</sup>. Otra opción es el marcaje de las células nucleadas utilizando marcadores de ADN como el naranja de tiazol, el LDS-751, el Hoechst-33342, el DyeCycle™ Violet y el DyeCycle Ruby<sup>98-100</sup>. También cabe mencionar, la combinación del marcaje fenotípico y de ADN como reportaron Terstappen y Loken<sup>98</sup> permitiéndoles diferenciar diversas poblaciones celulares.

En el segundo caso se explora la absorbancia diferencial de la oxihemoglobina a 488 nm y 405 nm. De manera que presentan un patrón de dispersión de la luz diferente entre ambos<sup>101</sup>.

#### 4. Modelos de transferencia de la investigación básica a la clínica

La transferencia de los descubrimientos y avances está ligada intrínsecamente a la investigación traslacional, la cual, busca transferir la investigación básica a la aplicación clínica.

Se han descrito diversos modelos para favorecer la transferencia de la investigación básica a la aplicación clínica. El primer modelo, denominado *benchside*, únicamente contemplaba la transferencia unilateral de los descubrimientos científicos del laboratorio a las aplicaciones clínicas<sup>102</sup>. Posteriormente, evolucionó al concepto de *two-way bridge* en el que se contemplaba la retroalimentación del *bedside* al laboratorio<sup>103</sup>, ayudando a redefinir o crear nuevas hipótesis para dirigir los esfuerzos en realizar descubrimientos innovadores. Más adelante, la Sociedad Europea para la Medicina Traslacional (EUSTM, *European Society for Translational Medicine*) incluyó la “comunidad” como el tercer pilar de la medicina traslacional. La EUSTM define la comunidad o sujeto sobre el que repercute las intervenciones de la medicina traslacional, como el conjunto de la población sana, pacientes y profesionales de la medicina<sup>104</sup>.

También el propio NIH a través del Centro Nacional para el Avance de las Ciencias Traslacionales (NCATS, *National Center for Advancing Translational Sciences*), presentó un enfoque que se denominó espectro de ciencia traslacional<sup>105,106</sup>. Este consta de cinco pilares interconectados entre ellos, simultáneamente centrados en la implicación del paciente. Estos pilares representan cada fase de la investigación, desde la investigación en el laboratorio hasta la aplicación que mejora la salud de los pacientes: la investigación básica, la investigación clínica, la investigación preclínica, la implementación clínica y la salud pública.

En la actualidad hemos vivido un caso excepcional con el desarrollo de las vacunas contra la COVID-19<sup>107</sup>, en el que a través de la cooperación internacional y unos esfuerzos sin precedentes tanto por parte de la industria farmacéutica, biotecnológica y biomédica, como los centros de investigación públicos y privados, y los organismos internacionales pertinentes, principalmente la WHO (*World Health Organization*), la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*), se están

desarrollando 315 vacunas, de las cuales 194 se encuentran en fase preclínica y 121 han alcanzado la fase clínica, en el momento de la redacción de esta Tesis<sup>108</sup>.

La transferencia de los descubrimientos científicos y mejoras para la práctica clínica es en su mayoría un proceso que requiere de mucho tiempo, con un elevado coste económico y de personal<sup>109</sup>, resultando fundamental para el avance de la medicina y repercutiendo en el beneficio de los pacientes y la sociedad.

### **4.1 Potencial de la transferencia de la citometría de flujo**

La citometría de flujo es una herramienta que permite acelerar la transferencia de grandes avances tecnológicos y metodológicos, como los explicados previamente<sup>47,61,65,110,111</sup>, en múltiples disciplinas debido a su versatilidad. Sin embargo, aún existen aspectos de mejora en la práctica clínica de laboratorio, como los que se tratan en esta Tesis.

Por ejemplo, en estudios de célula única por citometría de flujo, es fundamental que la información obtenida de cada célula se corresponda a una única célula y no a dos, conocido como dobletes y, para ello se aplican diversas tecnologías y metodologías. La metodología más ampliamente aplicada para discriminar los dobletes, basada en la dispersión de la luz, presenta ciertas limitaciones<sup>112,113</sup>.

Otro ejemplo es la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria, un método de evaluación clínica cuya base metodológica no se ha visto modificada durante décadas<sup>114</sup>. Además, es el método citoquímico de evaluación más utilizado en la práctica clínica habitual como parte de las pruebas necesarias en casos de trastornos hematológicos y enfermedades infecciosas. Aun siendo un método tan extensamente aplicado y de probada fiabilidad, su realización requiere la evaluación subjetiva dependiente del observador sobre 100 neutrófilos mediante microscopía óptica, y el establecimiento de un rango de valores normales de la actividad de la enzima en cada laboratorio.

Otro caso es el recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+. Este es necesario para determinar el momento de proceder con la leucoaféresis en el donante y, obtener una cantidad mínima de estas células para infundir en el paciente y asegurar que el injerto tenga éxito, así como reducir la morbilidad del paciente y el tiempo necesario para su recuperación hematológica. El método más ampliamente reconocido y aplicado es el basado en las recomendaciones de la ISHAGE, el cual ha permitido salvar incontables vidas humanas. Y a pesar de que este método ha recibido diversas actualizaciones y revisiones, aún puede ser mejorado en ciertos aspectos. Los aspectos de mejora tratados en esta Tesis son el fenómeno de la desaparición de las microesferas que puede afectar a estos recuentos, y la compensación de las fluorescencias de los marcadores utilizados según las recomendaciones de la ISHAGE<sup>42</sup>.

Otro punto es la disponibilidad de nuevos anticuerpos con certificación CE-IVD destinados para facilitar y/o mejorar el diagnóstico y seguimiento de patologías hematológicas e inmunitarias mediante citometría de flujo, así como para el diseño de paneles más simples o complejos y el avance de la medicina personalizada. Cabe destacar que el *International Working Group for Antibody Validation* publicó unas recomendaciones para la validación de anticuerpos basada en dos partes. La primera parte para verificar la especificidad de los anticuerpos, basada en 5 pilares de los cuales se sugería cumplir con al menos uno de ellos: estrategias genéticas, estrategias ortogonales, estrategias de anticuerpos independientes, expresión de proteínas marcadas e inmunocaptura seguida de espectrometría de masas. Y una segunda parte de validación funcional, para evidenciar que el anticuerpo se une al objetivo deseado.

En el caso de anticuerpos RUO con los que se quiere obtener el certificado CE-IVD, se requiere que estos superen una serie de criterios de aceptación. Estos criterios incluyen diferentes aspectos que precisan la aplicación de conocimientos inmunológicos, biológicos, clínicos y especialmente de citometría de flujo. Por lo tanto, la validación y certificación CE-IVD de nuevos anticuerpos, que dotaría a los profesionales clínicos de un amplio catálogo de nuevos reactivos para el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías, es un ejemplo de transferencia directa de los conocimientos y avances del laboratorio a la práctica clínica en la citometría de flujo.



## HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

La citometría de flujo es una tecnología de gran relevancia para el avance de la investigación y la medicina. Esto se debe al enorme potencial que tiene para el análisis celular de alto rendimiento a nivel de célula única, y que se ha visto incrementado debido a mejoras metodológicas y tecnológicas.

Entre las metodológicas, destaca la de mínima manipulación de la muestra, al permitir analizar las células en su estado nativo y tiempos de preparación muy inferiores a los requeridos habitualmente en otras aplicaciones de investigación traslacional.

La hipótesis en esta Tesis se fundamenta en que la citometría de flujo y los métodos de mínima manipulación de la muestra, deben poder permitir niveles de transferencia alternativos, con una repercusión directa sobre el beneficio de los pacientes.



## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es demostrar el potencial de la citometría de flujo para la transferencia del laboratorio de investigación a la clínica, que se encuentra a diferentes niveles: el primer nivel es metodológico, especialmente mediante los métodos de mínima manipulación de la muestra. En el segundo nivel se encuentra la adaptación de otras técnicas a la citometría de flujo. En el tercer nivel se demuestran las ventajas de la implementación de tecnologías en pruebas clínicas. Y, en el cuarto nivel la validación de nuevas herramientas diagnósticas para el diagnóstico de enfermedades hematológicas y del sistema inmunitario.

Para demostrar los diferentes niveles de transferencia de la citometría de flujo, se han realizado cuatro estudios con objetivos concretos:

### Del **primer estudio**:

- Demostrar las ventajas y aplicabilidad de metodologías que permiten la mínima manipulación posible de las muestras biológicas y sus ventajas para identificar células patológicas.

### Del **segundo estudio**:

- Aplicar la transferencia de la citometría de flujo sobre el método citoquímico de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria, mediante la mínima manipulación de las muestras para detectar dicha actividad en su estado nativo a nivel celular.

### Del **tercer estudio**:

- Demostrar que la determinación de progenitores hematopoyéticos CD34+ puede realizarse con mayor precisión gracias a la utilización de sistemas volumétricos reales y excitación con láseres de 561 nm como estrategia de implementación de las recomendaciones ISHAGE.

### Del **cuarto estudio**:

- Otorgar la acreditación CE-IVD a una larga serie de anticuerpos monoclonales para su posterior utilización en procedimientos de diagnóstico clínico.



## MATERIALES Y MÉTODOS



**Los materiales y métodos descritos a continuación se utilizaron para el desarrollo de los siguientes estudios:**

**Estudio I:** Comparación de la dispersión de la luz y la medición de la fluorescencia en la discriminación de dobletes

**Estudio II:** Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria mediante citometría de flujo

**Estudio III:** Cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+ mediante sistemas volumétricos

**Estudio IV:** Validación de anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos para el marcado CE-IVD

## **1. Muestras biológicas**

### **1.1 Pacientes y donantes sanos**

Todos los donantes de muestras biológicas incluidas en los estudios realizados proporcionaron su consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los procedimientos fueron en acuerdo con los protocolos internos del laboratorio, autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP) (Badalona).

En el **primer estudio**, se obtuvieron muestras de sangre periférica de n=24 donantes sanos, anticoaguladas mediante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las muestras pertenecían a 8 hombres y 16 mujeres con una media de edad de 59 años, en un rango de 25 – 82 años. Adicionalmente, se recogieron e incluyeron en el estudio, muestras de leucoaféresis de n=2 donantes alogénicos de células madre.

En el **segundo estudio**, se obtuvieron muestras de sangre periférica para la realización de la prueba citoquímica de la fosfatasa alcalina granulocitaria como orientación diagnóstica.

El personal técnico del departamento de Hematología del HUGTiP preparó las extensiones en portaobjetos fijándolas con una solución de metanol-formol. Inmediatamente después de la preparación de las extensiones, el volumen residual de cada muestra de sangre periférica fue utilizado para la realización de este estudio.

Las muestras procedían de 32 pacientes, 17 hombres y 15 mujeres, con una media de edad de 51 años, en un rango de 5 – 88 años.

En el **tercer estudio**, las muestras utilizadas procedían de sangre periférica (n=14) y sangre periférica movilizada (n=41) de donantes de progenitores hematopoyéticos que habían recibido factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) glicosilado o no glicosilado.

Las muestras fueron preparadas y adquiridas en el citómetro Cytomics FC500™ (Beckman Coulter™) por el personal técnico del departamento de Hematología del HUGTiP siguiendo las recomendaciones de la ISHAGE<sup>55</sup>.

Estas mismas muestras fueron utilizadas en este estudio inmediatamente después de su análisis para el recuento clínico de células progenitoras hematopoyéticas CD34+. Las muestras procedían de 55 pacientes, 23 hombres y 32 mujeres, con una edad media de 59 años, en un rango de 20 – 88 años.

En el **cuarto estudio**, se obtuvieron n=562 muestras de sangre periférica y de aspirados de médula ósea, de 308 hombres y 254 mujeres, con una edad media de 59 años, en un rango de 2 – 97 años.

## 2. Reactivos y equipamiento

### 2.1 Citómetro de flujo

- Attune™ Focusing Fluid (1x) (Thermo Fisher Scientific™, cat. no. A24904)
- Attune™ NxT Flow Cell Cleaning Solution (Invitrogen™, cat. no. A43635)
- Attune™ Performance Tracking Beads (Thermo Fisher Scientific™, cat. no. 4449754)
- Attune™ Shutdown Solution (Thermo Fisher Scientific™, cat. no. A24975)
- Attune™ Wash Solution (Thermo Fisher Scientific™, cat. no. A24974)
- Flow Check™ Pro Fluorospheres (Beckman Coulter™, cat. no. A63493)
- Flow Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter™, cat. no. 7547053)
- IsoFlow™ Sheath Fluid (Beckman Coulter™, cat. no. 8546859)

### 2.2 Anticuerpos monoclonales y policlonales

En el **primer** y tercer **estudio** se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anti-Human CD34 PE, clon 581 (IOtest® Beckman Coulter™, cat. no. IM1871)
- Anti-Human CD45 FITC, clon J33 (IOtest® Beckman Coulter™, cat. IM0782)

Por razones de confidencialidad se ha omitido la información del proveedor y número de producto de los anticuerpos utilizados en el **cuarto estudio**. Estos anticuerpos se encuentran listados en el ANEXO II.

### 2.3 Sondas vitales fluorescentes para ADN

- Hoechst-33342 (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. H1399)
- Vybrant® DyeCycle™ Violet (DCV) Stain (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. V35003)

## 2.4 Sustrato fluorogénico

- Alkaline Phosphatase Live Stain (APLS) (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. A14353)

## 2.5 Soluciones, medios y tampones

- Aceite de inmersión para microscopía (Merck Millipore, cat. no. 1.04699.0100)
- BD FACSTFlow™ sheath fluid (Becton Dickinson, cat. no. 342003)
- CyLyse™ (Sysmex, cat. no. 05-5010)
- Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat. no. HBSS-2A)
- IntraPrep™ Permeabilization Reagent (Beckman Coulter™, cat. no. A07803)
- LEUCOGNOST® ALPA (Merck Millipore, cat. no. 1.16300) (discontinuado)
- OptiLyseC™ Lysing Solution (Beckman Coulter™, cat. no. A11895)
- PharmLyse™ (Becton Dickinson, cat. no. 555899)
- Solución de lisis de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 10x:
  - Agua destilada
  - 1,5 M NH<sub>4</sub>Cl; Ammonium Chloride (Sigma-Aldrich® cat. no. A9434)
  - 100 mM NaHCO<sub>3</sub>; Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich® cat. no. S5761)
  - 1 mM C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>; EDTA, disodium salt (Calbiochem® cat. no. 324503)Preparada a pH: 7,4 (ajustado con HCl 1N y NaOH 1N)

### 3. Instrumentación

#### 3.1 Citometría de flujo

Los citómetros de flujo utilizados en los 4 estudios realizados en esta tesis fueron los siguientes:

- Applied Biosystems™ Attune™ Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific™)
- Invitrogen™ Attune™ NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific™, cat. no. A24858)
- Navios™ EX flow cytometer (Beckman Coulter™, cat. no. B83535)
- Cytomics FC500™ (Beckman Coulter™, cat. no. 722238) (discontinuado)

#### 3.2 Inicialización de los citómetros de flujo

En los citómetros Attune™, Attune™ NxT, Navios™ EX y Cytomics FC500™, se comprobó que los niveles de fluidos fuesen los requeridos por el fabricante. A continuación, se realizó una inspección visual para comprobar que no se hubiesen producido fugas del sistema fluídico, ni la formación de depósitos salinos, indicadores de alguna posible fuga. Se revisó el sistema de dispensación de la muestra y la bancada de filtros ópticos. Acto seguido, se inició el citómetro para ejecutar el encendido de los láseres y cebar el sistema fluídico. Seguidamente, en los citómetros de flujo Attune™ y Attune™ NxT, se procedió a realizar el control de calidad diario mediante microesferas de calibración. Una vez completada la verificación, se procedió a realizar un aspirado rápido de agua desionizada filtrada a 0.2 µm, eliminando cualquier rastro de ruido de fondo.

Semanalmente se realizó una higienización del sistema fluídico del citómetro Attune™ NxT mediante la función *Deep Clean*. Esta función permite higienizar el sistema fluídico incluyendo la cámara de flujo<sup>115</sup>. Para ello se adquirió una dilución de la solución Attune™ NxT Flow Cell Cleaning Solution en proporción 1:3 en agua destilada.

En el citómetro Navios™ EX, se realizó un procedimiento similar, utilizando las microesferas Flow Check™ Pro Fluorospheres. En primer lugar, se realizó el encendido del equipo y el programa Navios™ Cytometer 1.3. Seguidamente, se realizó la calibración del sistema para el control de calidad requerido.

Se verificó que el coeficiente de variación fuese inferior a 2.0 (Figura 2), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados de la verificación diaria del equipo se almacenaron en formato digital e impreso, firmado por los responsables del análisis.

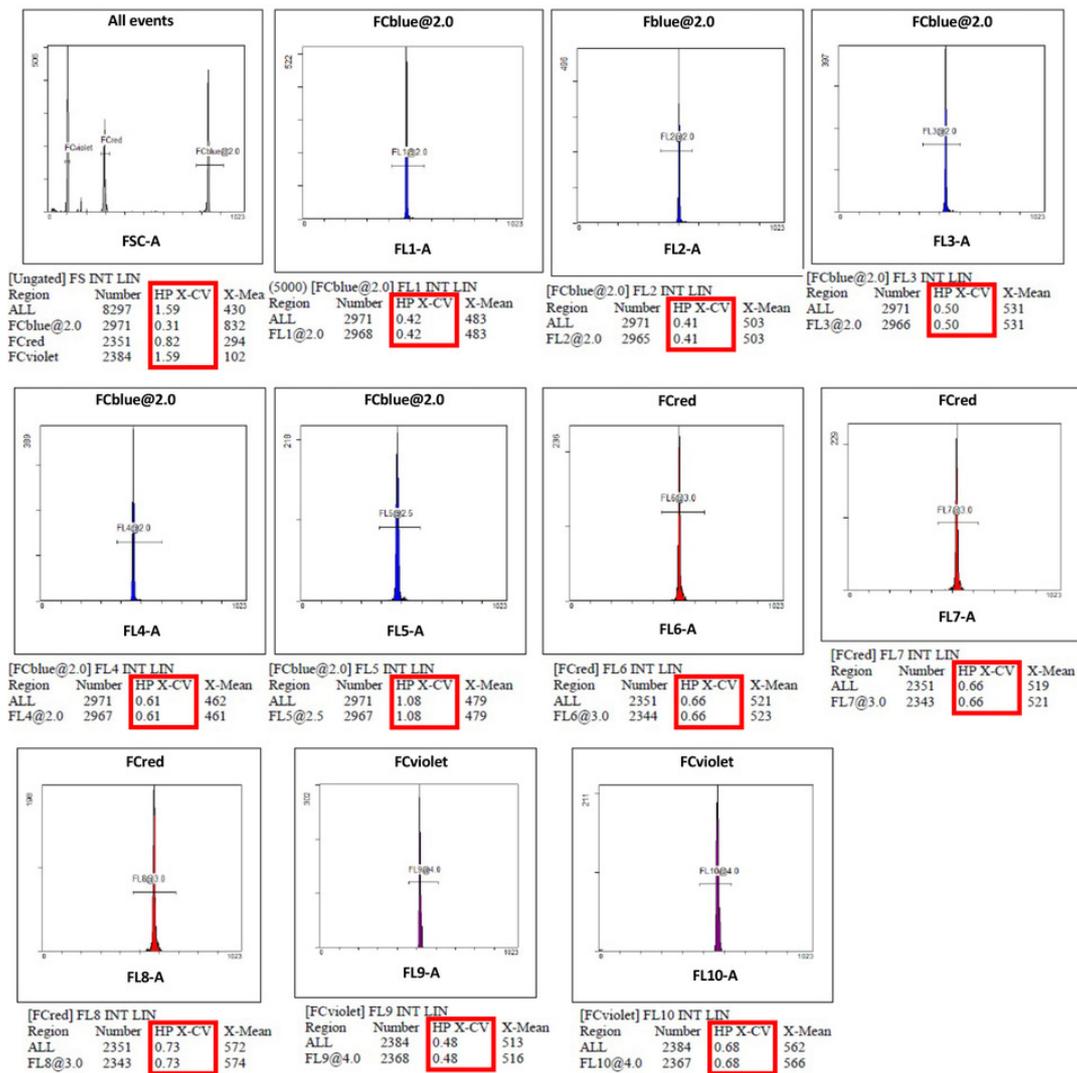


Figura 2. Histogramas del protocolo de control diario del citómetro Navios™ EX. Se representan las microesferas Flow Check™ Pro Fluorospheres detectadas por cada detector. Cada pico, debe tener un coeficiente de variación inferior a 2 para superar el control. Los coeficientes de variación para cada pico se muestran en los respectivos gráficos de cada detector.

### 3.3 Configuración de filtros

En los citómetros de flujo utilizados en esta Tesis Doctoral, se utilizaron los siguientes tipos de filtros:

Filtros de paso largo (*LongPass*, LP), que permiten el paso de la luz por encima de una longitud de onda determinada; filtros de paso corto (*ShortPass*, SP), que permiten el paso de la luz por debajo de una longitud de onda determinada; filtros de paso de banda (*BandPass*, BP), que permiten que solo la luz incluida en un rango específico pase a través. Asimismo, los filtros LP y SP que contengan una capa de espejo se denominan filtros dicróicos de paso largo (*Dichroic LP*, DCLP) y de paso corto (*Dichroic SP*, DCSP), permitiéndoles reflejar la luz no filtrada en un sentido determinado (**Figura 3**).

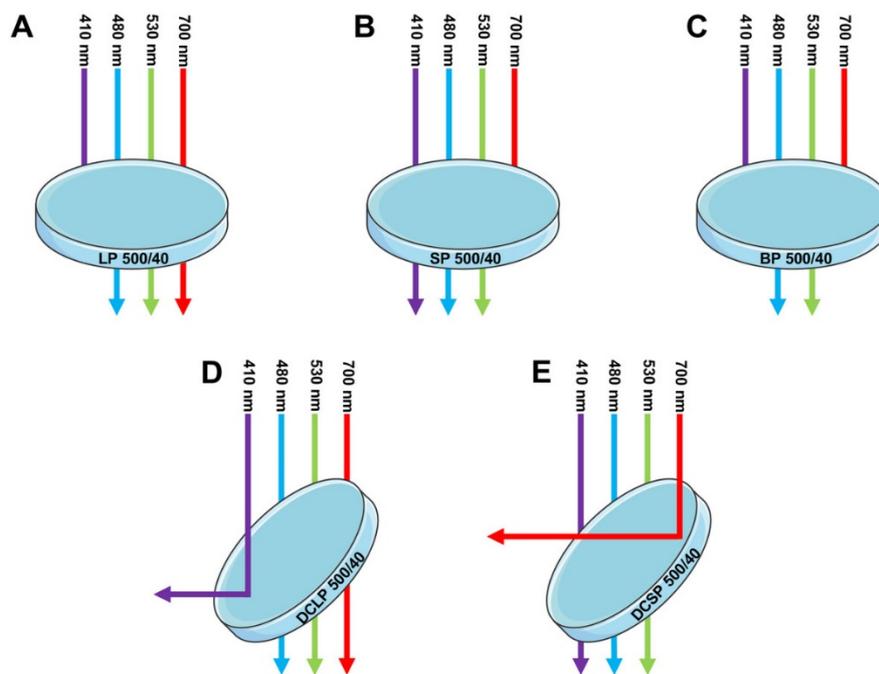


Figura 3. Tipos de filtros de citómetros de flujo. (A) Filtro de paso largo. (B) Filtro de paso corto. (C) Filtro de paso de banda. (D) Filtro dicróico de paso largo. (E) Filtro dicróico de paso corto. (Imagen adaptada de *Life Technologies Corporation, 2015*<sup>116</sup>).

### 3.3.1 Configuración de filtros del citómetro de flujo de enfoque acústico

#### Attune™

El citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™, se utilizó en el primer estudio para poder comparar los valores obtenidos con el Attune™ NxT y, en el segundo estudio para evitar el converger con los compañeros, debido a que se requería adquirir las muestras en el menor tiempo posible.

En el **primer estudio**, los parámetros FSC y SSC, se obtuvieron mediante la iluminación del láser violeta a 405 nm de longitud de onda y sus señales se recogieron con las siguientes configuraciones de filtros: 405/10 BP para la FSC, y 500 DLP, 410 DLP y 405/10 BP para la SSC.

Simultáneamente, el marcador específico de ADN, DCV, fue excitado con el mismo láser, y su emisión fue recogida con la configuración 500 DLP, 410 DLP y 450/40 BP en el detector VL1. Alternativamente, el marcador Hoechst-33342 también ha sido utilizado eficientemente, aunque su máximo de excitación se encuentra en el rango de luz ultravioleta.

En el **segundo estudio** los parámetros de dispersión de la luz y los marcadores específicos de ADN se obtuvieron siguiendo las mismas especificaciones utilizadas en el primer estudio.

La emisión derivada de APLS se recogió mediante la combinación 555 DLP y 530/30 BP en el detector BL1.

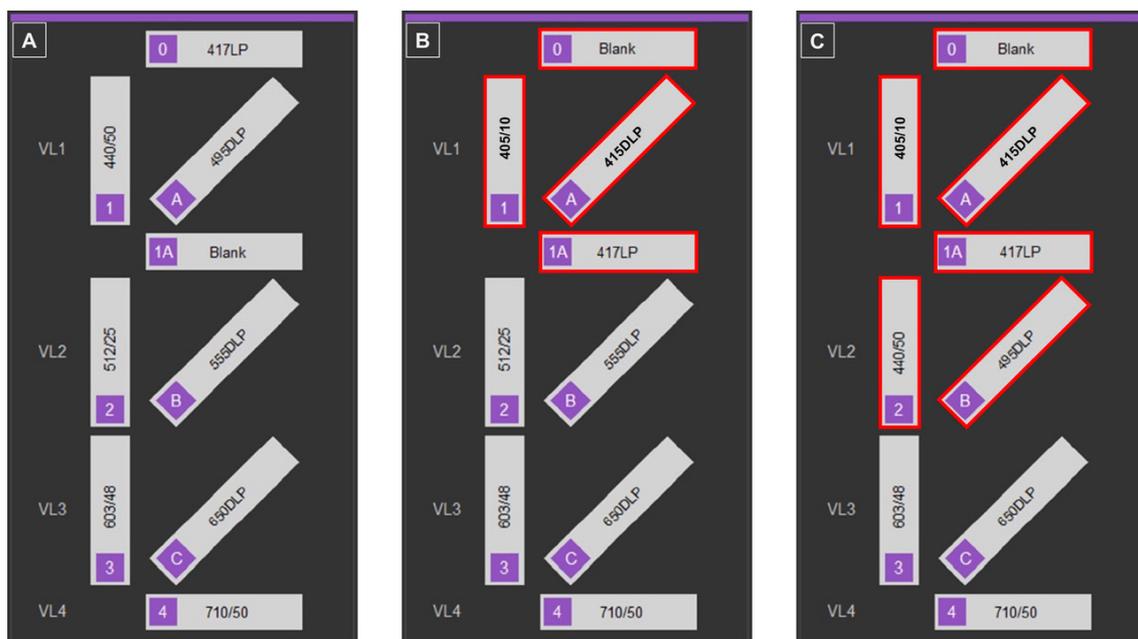
### 3.3.2 Configuración de filtros del citómetro de flujo de enfoque acústico

#### Attune™ NxT

La configuración de filtros ópticos para el láser violeta se modificó como se observa en la **Figura 4**, permitiendo detectar la dispersión lateral de la luz producida por el láser violeta en el detector VL1 (**Figura 4 B**). Al realizar esta modificación de la distribución de los filtros, la fluorescencia de los marcadores de ADN pasaba a recogerse mediante los filtros 495 DLP y 440/50 nm en el detector VL2 (**Figura 4 C**).

En el **primer estudio**, el parámetro de la FSC se obtuvo mediante la iluminación del láser azul a 488 nm de longitud de onda y, el SSC se obtuvo mediante la iluminación del láser violeta a 405 nm de longitud de onda y del láser azul. Sus señales se recogieron con las siguientes configuraciones de filtros: para la FSC, 488/10 BP; para el SSC-violeta, 405/10 BP en el detector VL1; y para el SSC-azul, 488/10 BP.

El marcador DCV se excitó con el láser violeta a 405 nm y sus emisiones se recogieron con 417 LP, 495 DLP y 440/50 BP en el detector VL2 (**Figura 4 C**). Las adquisiciones se realizaron por duplicado, utilizando la característica de este equipo para desactivar el aborto electrónico de los elementos coincidentes, explicados en el apartado 1.1 del Estudio I, permitiendo registrar estos eventos coincidentes para el sistema electrónico, y sin desactivar dicha opción, registrando los eventos de forma similar a como lo realizan otros citómetros de flujo.



**Figura 4.** Disposición de filtros del kit de filtros Invitrogen™ Attune™ No-Lyse No-Wash Filter Kit. (A) Configuración original de los filtros y detectores para las emisiones producidas con el láser violeta. (B) Configuración para la detección de la dispersión lateral mediante el láser violeta en el detector VL1. (C) Configuración para la detección simultánea de la dispersión lateral en el detector VL1 y de las emisiones producidas por las sondas de ADN fluorescentes en el detector VL2. (Imagen adaptada de *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies*<sup>23</sup>).

En el **segundo estudio**, los parámetros de dispersión de la luz, así como las emisiones de los marcadores específicos de ADN, se obtuvieron siguiendo las mismas especificaciones

del primer estudio (**Figura 5 C**). La emisión derivada de APLS, se recogió con la configuración de filtros utilizada para el fluorocromo FITC en el detector BL1.

En el **tercer estudio**, los parámetros de dispersión de la luz (FSC, SSC) se obtuvieron siguiendo las mismas especificaciones del estudio previo (**Figura 4 B**).

El CD45 FITC se excitó con el láser azul a 488 nm y sus emisiones se recogieron con 495 DLP, 496 LP, 555 DLP, y 530/30 BP en el detector BL1. El CD34-PE se excitó con el láser verde-amarillo a 561 nm y la emisión mediante la disposición 577 LP, 600 DLP, y 585/16 BP en el detector YL1. Este marcador se excitó a 561 nm en lugar de 488 nm, para obtener una mayor separación entre la población positiva y negativa y a su vez para evitar problemas derivados de la superposición de los espectros de emisión entre FITC y PE, tal y como está descrito en una publicación previa del grupo<sup>59</sup>.

### 3.3.3 Configuración de filtros del citómetro de flujo Navios™ EX

El citómetro de flujo Navios™ EX se utilizó en la realización del estudio de validación de anticuerpos monoclonales para su marcaje CE-IVD. Este citómetro dispone de tres láseres: azul, rojo y violeta, en disposición colineal.

La configuración de los filtros ópticos y detectores se muestra en la siguiente figura (**Figura 5**).

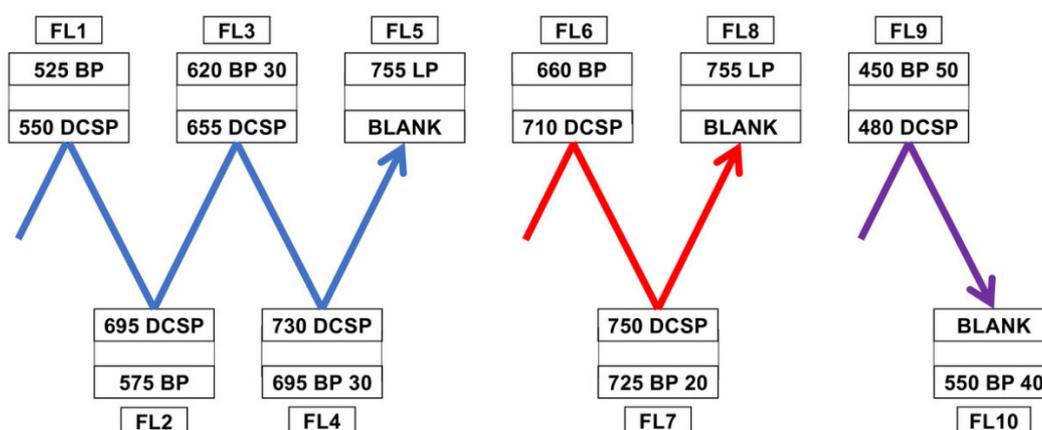


Figura 5. Configuración de los filtros ópticos para cada fuente de luz láser y detectores utilizados en el citómetro de flujo Navios™ EX. (Imagen adaptada de *Navios™ EX Flow Cytometer – Instruction for use*, 2020<sup>117</sup>).

Los fluorocromos FITC, PE, ECD, PerCP y los tándems PE-CF594, PE-DyLight594, PerCP-Cy5.5 y PE-Cy7, se excitaron con el láser azul.

Los fluorocromos APC, AF700 y los tándems APC-H7, APC-R700, APC-AF750 y APC-Cy7, se excitaron con el láser rojo. Los fluorocromos Pacific Blue™, V450 y Pacific Orange™, se excitaron con el láser violeta.

En la siguiente tabla (**Tabla 1**), se detallan las longitudes de onda y detectores para los fluorocromos utilizados en el estudio.

| Fluorocromo    | Fuente de excitación | Excitación | Emisión/es   | Detector/es |
|----------------|----------------------|------------|--------------|-------------|
| FITC           | Láser Azul           | 494 nm     | 520 nm       | FL1         |
| PE             | Láser Azul           | 496 nm     | 578 nm       | FL2         |
| ECD            | Láser Azul           | 488 nm     | 613 nm       | FL3         |
| PE-CF594       | Láser Azul           | 496 nm     | 612 nm       | FL3         |
| PE-DyLight594  | Láser Azul           | 496 nm     | 618 nm       | FL3         |
| PE-Texas Red   | Láser Azul           | 496 nm     | 615 nm       | FL3         |
| PerCP          | Láser Azul           | 482 nm     | 678 nm       | FL4         |
| PerCP-Cy5.5    | Láser Azul           | 482 nm     | 676 nm       | FL4         |
| PE-Cy7         | Láser Azul           | 496 nm     | 785 nm       | FL5         |
| APC            | Láser Rojo           | 650 nm     | 660 nm       | FL6         |
| APC-H7         | Láser Rojo           | 640 nm     | 650 y 785 nm | FL6 y FL8   |
| AF700          | Láser Rojo           | 702 nm     | 723 nm       | FL7         |
| APC-R700       | Láser Rojo           | 652 nm     | 704 nm       | FL7         |
| APC-AF750      | Láser Rojo           | 650 nm     | 775 nm       | FL8         |
| APC-Cy7        | Láser Rojo           | 650 nm     | 785 nm       | FL8         |
| Pacific Blue   | Láser Violeta        | 410 nm     | 455 nm       | FL9         |
| V450           | Láser Violeta        | 404 nm     | 448 nm       | FL9         |
| Pacific Orange | Láser Violeta        | 400 nm     | 551 nm       | FL10        |

**Tabla 1.** Lista de los fluorocromos conjugados a los anticuerpos estudiados, junto con su respectiva fuente de excitación, longitudes de onda de excitación y emisión, y el detector donde se recogieron sus fluorescencias<sup>118-121</sup>.

### 3.4 Adquisición de las muestras

Los parámetros de dispersión de la luz se representaron en escala lineal, excepto en la determinación de la expresión antigénica de plaquetas en el cuarto estudio, donde se representaron en escala logarítmica.

En el **primer y segundo estudio** en los que se aplicaron protocolos basados en la metodología de mínima manipulación de la muestra, los umbrales de detección se establecieron empíricamente según la positividad de las poblaciones marcadas con los marcadores fluorescentes de ADN, en el detector VL1 en el citómetro de flujo Attune™ y el detector VL2 en el Attune™ NxT. Se utilizó un gráfico de dos parámetros que enfrentaban el SSC-H y el marcador de ADN, para así eliminar de la detección los eritrocitos presentes en sangre periférica, así como el ruido de fondo.

También, se ajustaron los voltajes de los detectores FSC y SSC según la relación señal/ruido y las características de dispersión de la luz de las células nucleadas de la muestra; y en el segundo estudio, además, se ajustó el detector BL1 para la intensidad de fluorescencia derivada de APLS.

El parámetro de pulso de la luz utilizado, en la adquisición y análisis de las muestras, fue la altura (*Height*, H) ya que es el más adecuado para clasificar las células en muestras de sangre no lisadas, debido a la contribución de los eritrocitos al parámetro área. En ambos estudios, se adquirieron 20,000 células nucleadas a 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

En el **tercer estudio**, una vez finalizada la adquisición de la muestra en el citómetro Cytomics FC500™, esos mismos tubos fueron recepcionados y adquiridos en el Attune™ NxT.

Las muestras se resuspendieron por inversión y se adquirieron a 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  para minimizar la coincidencia.

El umbral de detección se configuró según la fluorescencia de CD45 FITC (BL1), utilizando un gráfico de dos parámetros que enfrentaba el SSC-H y el CD45 FITC-H, para así excluir aquellos eventos que no fuesen leucocitos.

Asimismo, se ajustaron los voltajes de los detectores del FSC, SSC, BL1, YL1 (CD34 PE) en el Attune™ NxT, y las muestras se adquirieron en duplicado, con un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ .

Al finalizar la adquisición de cada muestra, se higienizó la aguja de aspiración del citómetro para evitar cualquier posible contaminación entre muestras.

En el **cuarto estudio**, cada muestra fue adquirida por duplicado, marcada con el anticuerpo competidor y el anticuerpo a validar. La velocidad de adquisición se ajustó

en función de la concentración celular de la muestra, aproximadamente a 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , finalizando a los 50.000 eventos en la región correspondiente a las células CD45+.

El umbral de detección se configuró según la dispersión frontal de la luz. En las adquisiciones para el análisis de marcadores de plaquetas, el umbral se configuró según la dispersión lateral de la luz. Los voltajes se ajustaron con las muestras preparadas con el anticuerpo competidor para realizar la comparación por pares. Cualquier modificación en los voltajes durante la adquisición fue debidamente justificada y reportada.

En la adquisición de todas las muestras, se realizó la función de higienización transcurridos al menos 20 segundos desde el inicio de la adquisición para borrar los datos de los eventos adquiridos durante dicho periodo y guardar los datos cuando el flujo de adquisición de la muestra es más homogéneo.

### **3.5 Microscopía óptica**

Los microscopios ópticos empleados para el recuento manual de leucocitos y la obtención de fotografías de extensiones de muestras, así como la cámara fotográfica, fueron los siguientes respectivamente:

- Microscopio óptico Motic™ AE31 Elite Trinocular (Motic™)
- Microscopio óptico Olympus™ BX53F (Olympus™)
- Cámara Olympus™ DP21 (Olympus™)

## 4. Procedimientos generales

### 4.1 Consideraciones previas a la realización de los experimentos

Con la finalidad de optimizar los pasos del procesamiento y adquisición de las muestras, así como minimizar posibles causas de variabilidad, se verificaron los siguientes pasos antes, durante y al finalizar la realización de cada experimento:

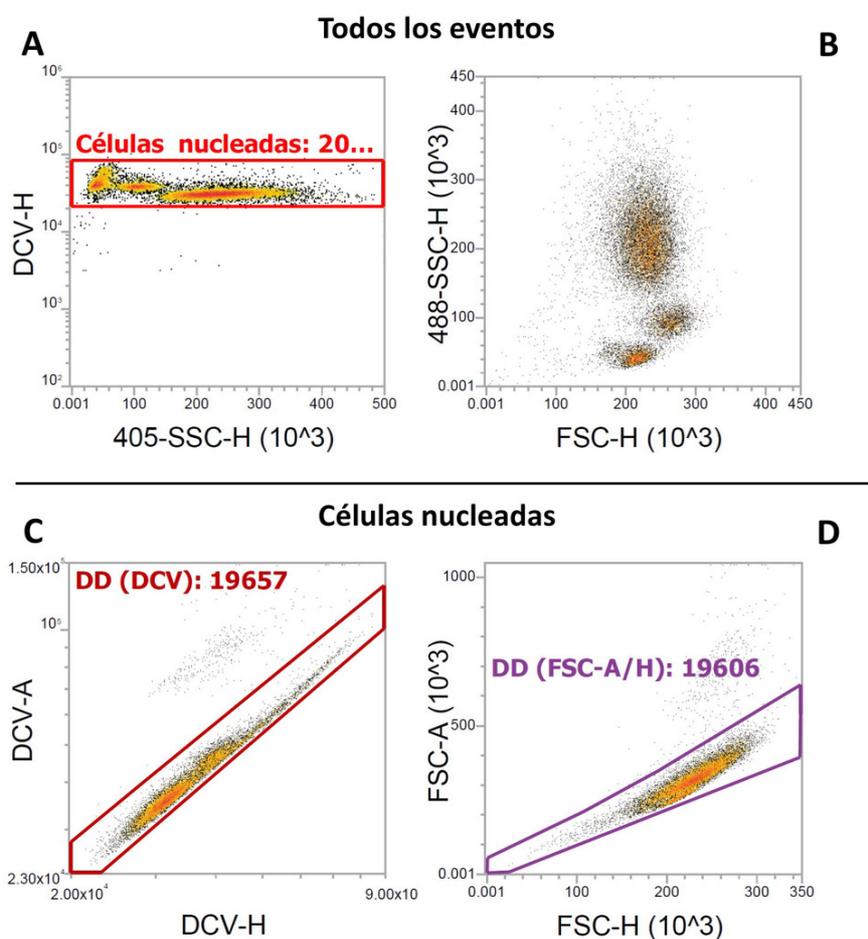
- Las muestras se mantuvieron en un agitador basculante a velocidad lenta, desde la obtención de las muestras hasta la finalización del experimento; con la finalidad de evitar la precipitación y agregación celular.
- En los experimentos donde se requirió una incubación de las muestras a 37 °C, se verificó previamente la temperatura del baño húmedo con termómetro de mercurio. Asimismo, los reactivos preservados a 4 °C y -20 °C, se atemperaron protegidos de la luz previamente a su utilización.
- Las fluoroesferas de calibración para recuento absoluto, se atemperaron minutos antes del procesamiento de las muestras y se resuspendieron por inversión suave.
- En el estudio de la fosfatasa alcalina granulocitaria, este procedimiento se realizó para cuantificar su actividad en el momento más próximo al de la fijación de la extensión.
- En el estudio de la cuantificación de los progenitores hematopoyéticos, se minimizó la diferencia del tiempo de adquisición entre los diferentes citómetros utilizados.
- El proyecto de validación de reactivos para el diagnóstico *in vitro* incluyó los siguientes puntos adicionales:
  - Estudio de las características del marcador objetivo previamente al procesamiento de las muestras.
  - Selección de marcadores adicionales necesarios para identificar la población de referencia.
  - Titulación de los anticuerpos competidores, especialmente cuando el fabricante no especifica el volumen o concentración necesaria en cada ensayo.

## 4.2 Discriminación de dobletes mediante fluorescencia

En este estudio se utilizaron los citómetros de flujo Attune™ y Attune™ NxT.

### 4.2.1 Protocolos de adquisición

El protocolo de adquisición en el citómetro Attune™ NxT se estableció como se muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Discriminación de dobletes por citometría de flujo utilizando marcadores de ADN fluorescentes (C) y según los parámetros de la dispersión de la luz (D), sobre 20000 células nucleadas (A, B), en el citómetro Attune™ NxT (DD, *Doublet Discrimination*).

El umbral de detección se configuró para DCV, y se representó en un primer *density plot* (**Figura 6 A**) enfrentado a la dispersión lateral de la luz del láser violeta (405-SSC-H), para seleccionar las células nucleadas.

Paralelamente (**Figura 6 B**), se verificó la distribución de las poblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos y granulocitos) según los parámetros de dispersión de la luz FSC-SSC (con el láser violeta y/o azul).

Sobre las poblaciones leucocitarias se enfrentaron los parámetros de área y altura para el marcador fluorescente de ADN, discriminando los dobletes como los eventos que presentan un mayor parámetro de área o amplitud, respecto el parámetro altura y seleccionando en una nueva ventana los singletes (**Figura 6 C**).

Adicionalmente, se discriminaron los dobletes en función de los parámetros área y altura de la dispersión frontal de la luz, sobre la población de células nucleadas (**Figura 6 D**).

De modo similar, se realizó el panel de adquisición en el citómetro de flujo Attune™ (**Figura 7**).

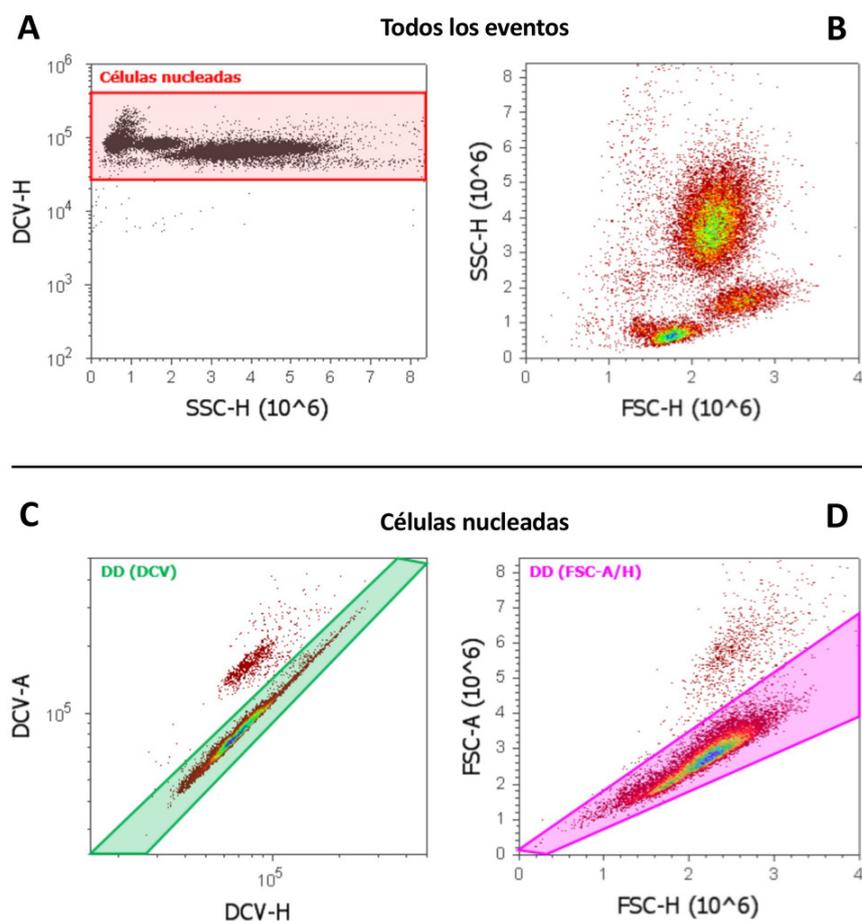


Figura 7. Discriminación de agregados por citometría de flujo utilizando marcadores de ADN fluorescentes (C) y según los parámetros de la dispersión de la luz (D) en el citómetro Attune™.

#### 4.2.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre periférica se procesaron en un tiempo inferior a las 6 horas después de su extracción, bajo tres condiciones y en paralelo:

- a) Sin mediar procedimientos de lisis y lavados celulares
- b) Mediante lisis de eritrocitos en formaldehído sin lavados celulares
- c) Mediante lisis con una solución de cloruro de amonio y lavados celulares

Se añadieron 50  $\mu$ L de HBSS mediante pipeteo reverso y DCV a una concentración final de 50  $\mu$ M en tres tubos Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente en cada tubo se añadieron 50  $\mu$ L de la muestra mediante pipeteo reverso, y se incubaron protegidos de la luz durante 15 minutos en un baño húmedo a 37 °C.

A partir de este punto, cada tubo se procesó según la condición asignada (a, b, c).

a) Se añadió HBSS hasta alcanzar un volumen final de 2.650  $\mu$ L, correspondiente al volumen máximo final para las tres diferentes condiciones. Simultáneamente a la dilución, se transfirió el volumen completo a un tubo de 3,5 mL de poliestireno.

b) Siguiendo las indicaciones del fabricante, se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo A del kit CyLyse™, para fijar las células y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (18-22 °C). Posteriormente se añadieron 2,5 mL del reactivo B para lisar los eritrocitos, transfiriendo simultáneamente el volumen total a un tubo de poliestireno de 3,5 mL y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente.

c) Se añadió 1 mL de la solución de lisis de cloruro de amonio y se incubó en posición horizontal hasta un máximo de 10 minutos, para favorecer la lisis de los eritrocitos de la manera más homogénea posible. Durante la incubación se realizaron inversiones manuales de los tubos Eppendorf en intervalos de 3-5 minutos.

En el agitador basculante, se mantuvo la mínima velocidad de oscilación y a los 5-7 minutos se verificó si la suspensión se observaba transparente, indicando que se había producido la lisis de los eritrocitos.

Una vez finalizado el procedimiento de lisis, se centrifugaron las muestras mediante microcentrifugación, con un pulso de 10 segundos a 16.000 rcf. Se descartó el sobrenadante mediante aspiración y se agitó el botón celular. Seguidamente se

resuspendió con 2.650  $\mu\text{L}$  de HBSS, transfiriendo el volumen total a un tubo de poliestireno de 3,5 mL.

Las muestras de **productos de leucoaféresis** se procesaron como se indica a continuación:

Se realizó una dilución 1/10 de la muestra en HBSS y se añadió DCV a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  ( $V_f = 100 \mu\text{L}$ ), y se incubó protegida de la luz durante 15 minutos en un baño húmedo a 37°C. Una vez finalizada la incubación, se añadieron los anticuerpos monoclonales CD34 PE y CD45 FITC y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Previamente a la adquisición, la muestra se diluyó con 1 mL de HBSS.

#### **4.2.3 Análisis de las muestras**

En este estudio se obtuvieron los datos de los eventos totales adquiridos, los eventos clasificados como singletes y la concentración celular. Los métodos estadísticos utilizados fueron el ANOVA y la prueba-T para recta de regresión.

### **4.3 Cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina por citometría de flujo**

Para la realización de este estudio, se utilizó el citómetro de flujo Attune™.

#### **4.3.1 Protocolos de adquisición**

La configuración del protocolo de adquisición en el citómetro de flujo Attune™ (**Figura 8**) se estableció como se muestra a continuación:

Los ejes correspondientes a las fluorescencias se presentaron en escala logarítmica hasta un máximo de 6 décadas de fluorescencia ( $10^6$ ), mientras que los ejes destinados a mostrar la dispersión de la luz violeta se presentaron en escala lineal.

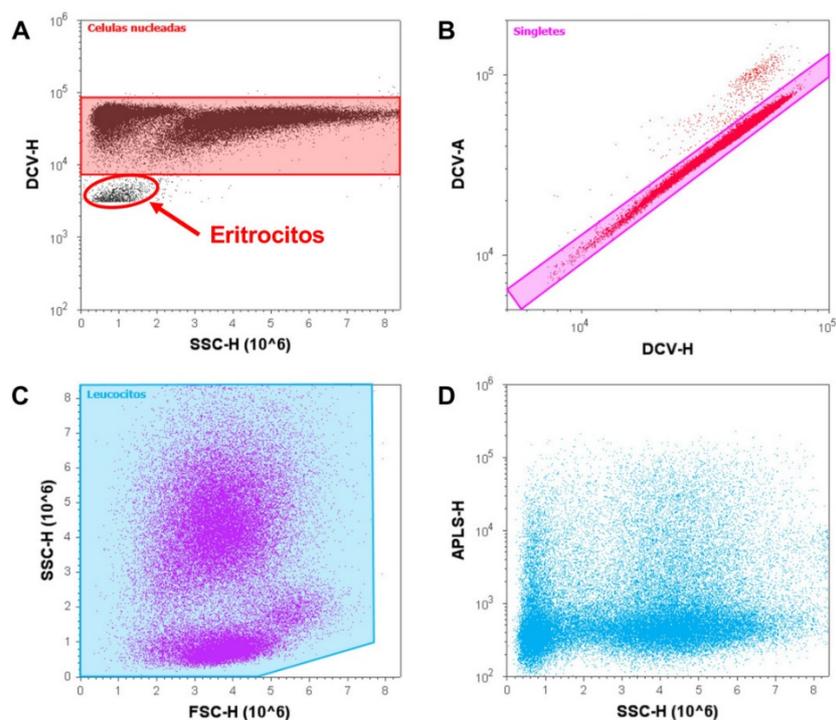
El nivel de umbral se configuró empíricamente según la fluorescencia del marcador DCV (VL1) utilizando un *dot plot* de dos parámetros para la dispersión lateral de la luz (405nm SSC-H) (**Figura 8 A**), enfrentado a la fluorescencia del marcador de ADN (DCV-H).

En el segundo gráfico, se discriminaron los dobletes enfrentando los parámetros área y altura de los marcadores fluorescentes, seleccionando la población de singletes (**Figura 8 B**).

En el tercer gráfico, se seleccionaron las poblaciones leucocitarias según sus propiedades de la dispersión frontal y lateral de la luz, y se ajustaron los voltajes de los detectores (**Figura 8 C**).

En el cuarto gráfico, se ajustó el voltaje para la autofluorescencia en el canal APLS, ajustando la población negativa de linfocitos entre la segunda y tercera década de fluorescencia para que todas las poblaciones se muestren por encima del ruido de fondo.

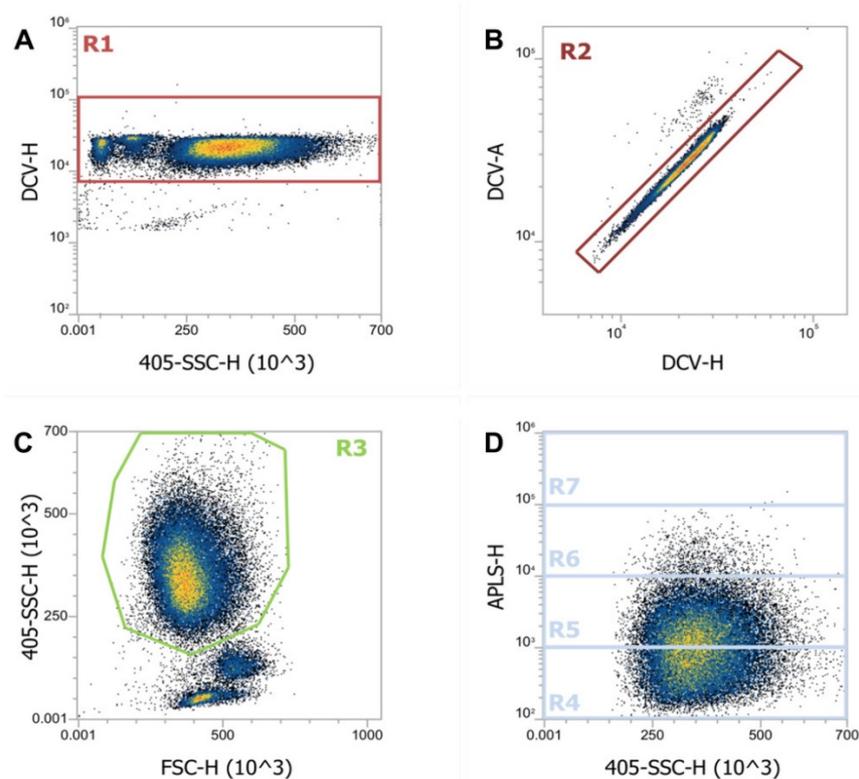
Previamente, se había definido la autofluorescencia mediante incubación a 4 °C de la muestra, con la finalidad de minimizar la actividad enzimática.



**Figura 8.** Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina en el citómetro Attune™. **A.** Selección de las células nucleadas según la intensidad de fluorescencia del marcador de ADN, discriminando los eritrocitos. **B.** Discriminación de agregados según los parámetros Área (A) y Altura (H) utilizando

marcaje fluorescente del ADN. C. Selección de las poblaciones leucocitarias según la dispersión frontal y lateral de la luz. D. Niveles de intensidad de fluorescencia correspondientes al nivel de actividad fosfatasa alcalina de las diferentes poblaciones leucocitarias.

La configuración del protocolo de adquisición en el citómetro de flujo Attune™ NxT mostrado en la **Figura 9** fue similar al utilizado en el citómetro Attune™.



**Figura 9.** Estrategia de análisis para la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina en el citómetro Attune™ NxT. A) Selección de las células nucleadas según la intensidad de fluorescencia del marcador de ADN, discriminando los eritrocitos en R1. B) Discriminación de agregados según los parámetros Área (A) y Altura (H) utilizando marcaje fluorescente del ADN en R2. C) Selección de la población granulocitaria según la dispersión frontal y lateral de la luz en R3. D) Niveles de intensidad de fluorescencia (R4 – R7) correspondientes a la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria.

#### 4.3.2 Preparación de las muestras

Las muestras de este estudio se prepararon mediante dos métodos distintos: el método citoquímico y el método de citometría de flujo de nuevo desarrollo.

### **Método citoquímico**

Se realizó una extensión de la muestra en un portaobjetos, se fijó por inmersión en una cubeta con una dilución 1/10 de metanol y formol durante un minuto, y transcurrido ese tiempo se lavó la extensión con agua corriente y se dejó secar al aire.

Por optimización del procedimiento, las extensiones fijadas de las muestras recibidas durante la semana se almacenaron protegidas de la luz hasta la realización semanal de la prueba, y valorar la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria como se explica a continuación.

La extensión seca de la muestra se incubó sumergida en la solución de la reacción citoquímica durante 30 minutos, protegida de la luz. Posteriormente se lavó el exceso de la solución de la extensión con agua destilada estéril y se dejó secar al aire, protegida de la luz.

Una vez desecada la extensión, se tiñó con solución de Mayer durante 5 minutos. Posteriormente se limpió el exceso de solución con agua corriente y se dejó secar la extensión.

Cuando la extensión estuvo seca, se procedió inmediatamente a su valoración en el microscopio óptico, como se detalla en el apartado “4.3.4 Análisis de las muestras”.

### **Citometría de flujo funcional**

Se calculó el volumen de sangre periférica necesario para obtener  $5 \times 10^5$  leucocitos, siendo los límites del volumen mínimo y máximo de la muestra 10  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  respectivamente. En los casos en los que no se pudo disponer del recuento celular en la base de datos clínica, se procedió a realizar el conteo manual en cámara de Neubauer, según el método de tinción de Türk<sup>122</sup>. Debido a que era necesario obtener el número de células para procesar la muestra en el menor tiempo posible, se optó por realizar el recuento manual en lugar de utilizar el citómetro de flujo para evitar converger con los compañeros.

Posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de HBSS en un tubo Eppendorf mediante pipeteo reverso, y se retiró el volumen equivalente a los  $5 \times 10^5$  leucocitos de la muestra. Se añadió el volumen requerido de la muestra mediante pipeteo reverso, y se homogeneizó muy suavemente.

Se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de DCV 5 mM y 1  $\mu\text{L}$  del sustrato APLS. Seguidamente se homogeneizó suavemente y se incubó la muestra protegida de la luz en un baño húmedo a 37 °C durante 20 minutos. Los controles negativos se incubaron a 4 °C para prevenir la actividad enzimática y detectar la autofluorescencia.

Después de la incubación, la muestra se resuspendió de nuevo suavemente con HBSS hasta obtener un volumen final predeterminado, para minimizar la coincidencia:

- 1 mL de volumen final, si el volumen inicial fue entre 10 y 30  $\mu\text{L}$ .
- 2 mL de volumen final, si el volumen inicial fue entre 31 y 60  $\mu\text{L}$ .
- 3 mL de volumen final, si el volumen inicial fue entre 61 y 100  $\mu\text{L}$ .

Las muestras se adquirieron inmediatamente en el citómetro de flujo Attune™.

### 4.3.3 Obtención de imágenes digitales de las extensiones de sangre

La obtención de las microfotografías se realizó mediante un microscopio óptico Olympus™ BX35, equipado con una cámara Olympus™ DP21, utilizando aceite de inmersión y un objetivo de 100 aumentos. Las microfotografías se tomaron con una resolución de 1600x1200 píxeles en formato .TIFF (*Tagged Image File Format*), pues permite evitar la compresión del archivo y la pérdida de datos.

### 4.3.4 Análisis de las muestras

Se desarrolló un nuevo método para cuantificar la actividad de la fosfatasa alcalina en granulocitos viables mediante citometría de flujo, basado en el estudio previo del grupo publicado en 2016<sup>62</sup>. Los resultados obtenidos con este nuevo método se compararon con los obtenidos mediante el método citoquímico para las mismas muestras. Cada centro establece su propia aproximación del método citoquímico para la valoración de la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria, así como el rango de valores normales de la actividad de la misma enzima.

La valoración según el **método citoquímico** consistió en el recuento de 100 neutrófilos de la extensión y su clasificación en 3 grados diferentes según la actividad de la enzima.

La actividad de la enzima se determinó según la intensidad incrementada del color ocre del precipitado citoplasmático formado como consecuencia de la actividad hidrolítica de la fosfatasa alcalina. Una vez clasificados los 100 neutrófilos, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el índice de actividad fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG) de la muestra:

$$\text{Índice actividad FAG} = (\text{neutrófilos grado 1}) \times 1 + (\text{neutrófilos grado 2}) \times 2$$

El rango de valores normales establecido en el Servicio de Hematología ICO-HUGTiP se situó entre 20 y 40. Estos valores se obtuvieron mediante controles internos y se establecieron tras la valoración de muestras de sangre normal o de pacientes con neutrofilia, con un tiempo inferior a 6 horas desde la extracción.

El nuevo método, además de basarse en la clasificación del método citoquímico, también se basó en la fórmula del *stain index* o índice de tinción para desarrollar una fórmula y poder cuantificar la actividad fosfatasa alcalina.

La autofluorescencia de las células se clasificó como grado 0 (G0), que corresponde a los leucocitos sin actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. La clasificación de este nivel se realizó utilizando la representación de un *density plot*, y esta población negativa se determinó con los controles incubados a 4 °C.

Cada década correspondiente a la escala de la fluorescencia por encima del nivel de autofluorescencia, se clasificó como grado 1 (G1), grado 2 (G2) y grado 3 (G3), utilizados para identificar y cuantificar los cambios en la mediana de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria y número de granulocitos. Esta clasificación de niveles se puede observar en la imagen representativa de la (**Figura 10**).

La fórmula desarrollada contempla individualmente cada una de las 4 clasificaciones de neutrófilos, según su actividad fosfatasa alcalina (**Figura 11**). La aplicación del porcentaje de neutrófilos en lugar del número total y el ajuste del número de leucocitos para el marcaje en cada muestra se realizó para reducir el desvío de los cálculos al comparar muestras de pacientes con diversas patologías como, por ejemplo, leucopenia o reacción leucemoide.

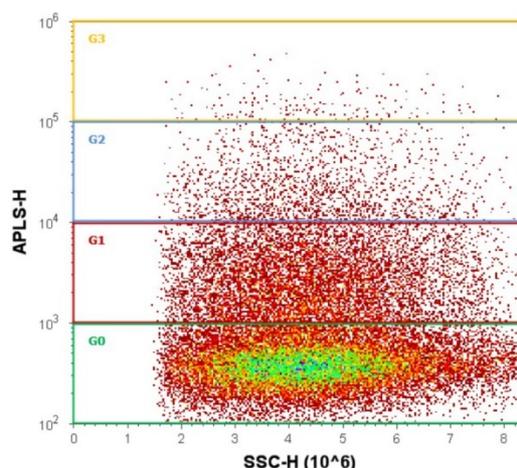


Figura 10. *Density plot* de dos variantes en el cual el eje X se representa la dispersión lateral de la luz (SSC-H) y en eje Y se representa la actividad de la fosfatasa alcalina (APLS-H). La región G0 contiene las células autofluorescentes (que no muestran actividad fosfatasa alcalina). Las regiones G1 a G3 contienen células de baja a alta intensidad de fluorescencia, usadas para identificar y cuantificar cambios en la mediana de la intensidad y número de granulocitos. Los neutrófilos se seleccionaron según la tinción de ácidos nucleicos, propiedades de la dispersión de la luz y singletes.

La mediana y la desviación estándar robusta se utilizaron en lugar de la media y la desviación estándar, debido a la distribución sesgada de poblaciones de neutrófilos por el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y para reducir el efecto de los valores atípicos.

$$\text{Índice APLS} = \left( \frac{(\text{Mdn}_{G1} - \text{Mdn}_{G0})}{\text{rSD}_{G0} \times 2} \right) \times \%G1_{\text{eventos}} + \left( \frac{(\text{Mdn}_{G2} - \text{Mdn}_{G0})}{\text{rSD}_{G0} \times 2} \right) \times \%G2_{\text{eventos}} + \left( \frac{(\text{Mdn}_{G3} - \text{Mdn}_{G0})}{\text{rSD}_{G0} \times 2} \right) \times \%G3_{\text{eventos}}$$

Figura 11. Fórmula para el índice de APLS, desarrollada para cuantificar la actividad fosfatasa alcalina en neutrófilos intactos, por medio de un sustrato fluorescente y permeable para la fosfatasa alcalina por citometría de flujo. La fórmula se basó en la fórmula del *stain index*, teniendo en cuenta la intensidad relativa de fluorescencia en cada nivel positivo y el porcentaje de neutrófilos para cada nivel.

Los análisis de las muestras se realizaron con el programa informático FCS Express™ 5 *Professional Standalone Research Edition*, versión 5.01.0080 (64-bit) (DeNovo Software).

#### 4.3.5 Análisis de intensidad de píxel

El primer objetivo consistió en comprobar si el método de análisis digital de la imagen se correspondía con la intensidad del color. Para ello se realizó el análisis digital de 91 imágenes de granulocitos de una misma muestra y se comparó el valor obtenido del análisis de intensidad de píxel, con el valor del grado de intensidad (0, 1 o 2) en el que fue clasificado cada granulocito según la intensidad del color del precipitado citoplasmático. Posteriormente se realizó el análisis digital en HSB (*Hue Saturation Brightness*) de otras 199 imágenes provenientes de otras 3 muestras diferentes.

El análisis de las imágenes en 32-bits se realizó con el programa ImageJ v1.50i, y el análisis en HSB, se realizó con el mismo programa, con la versión v1.52s, debido a que es un programa de acceso libre y utilizado ampliamente por la comunidad científica<sup>123-126</sup>.

##### 4.3.5.1 Análisis de imagen en 32-bits

Para poder cuantificar la mediana de la intensidad en la escala de grises de los píxeles del citoplasma, fue necesario discriminar los neutrófilos del resto de células y a su vez el espacio extracelular de la imagen, así como discriminar el citoplasma del núcleo en las mismas células.

Se realizó la conversión de la imagen a 32-bits o escala de grises, que permite utilizar la herramienta de ajuste del umbral de discriminación, y valorar la intensidad en un intervalo de 256 niveles. Correspondiendo el nivel 0 al color negro y el nivel 255 al color blanco.

El análisis se realizó como se describe a continuación. Se realizó la conversión a imagen en 32-bits (**Figura 12 B**). Una vez convertida a 32-bits se pudo discriminar el espacio extracelular utilizando la herramienta *Threshold adjustment tool* (**Figura 12 C**).

Se debe tener en cuenta que en la imagen se resalta en color rojo y en tiempo real aquello seleccionado para mantener por encima del umbral, y simultáneamente el histograma muestra la intensidad, con un intervalo máximo de valores de 0 a 255,

dependiendo del margen de valores que incluya la imagen. Se seleccionó la sección con valores con tendencia al 0, debido a que las células tienen una intensidad de color más oscura que el espacio extracelular. Se aceptaron los ajustes, eliminando el espacio extracelular de la imagen (**Figura 12 D**) y utilizando la herramienta de selección libre *Freehand selection tool*, se seleccionó la célula de interés (**Figura 12 E, F**). Se aísla correctamente la célula de interés, y de ser necesario se utiliza la misma herramienta de selección libre para seleccionar detalles que no pertenecen a dicha célula y eliminarlos. En caso de sobreponer parcialmente las células, se recomienda comparar la imagen en escala de grises con la imagen a color. Para cuantificar la intensidad de píxel del citoplasma, se tuvo que discriminar el núcleo de la célula. Debido a que el núcleo tiende a mostrar una intensidad más oscura que el citoplasma, se seleccionó la sección con valores más elevados mediante la herramienta *Threshold adjustment tool* (**Figura 12 G**). Para realizar una selección más precisa del núcleo, se recomienda utilizar como referencia la misma imagen en color, especialmente en células que presenten una elevada actividad fosfatasa alcalina o un menor volumen citoplasmático, debido a que puede producirse superposición en distinto grado entre la intensidad del precipitado y del núcleo.

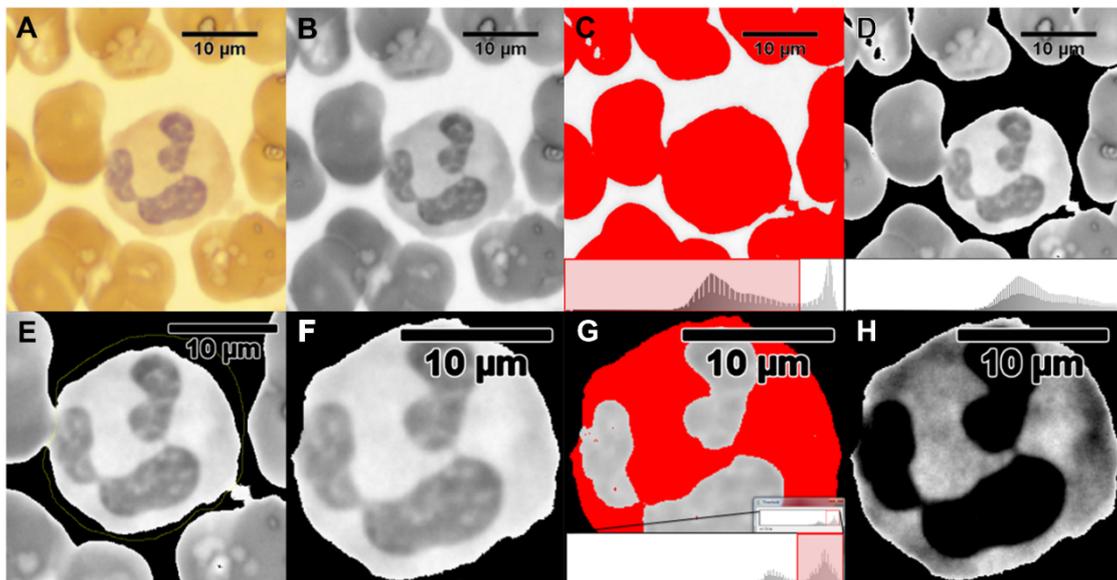


Figura 12. Procesamiento de imagen para el análisis de intensidad de píxeles de fotografías de microscopio. A. Fotografía de un neutrófilo obtenida a 100 aumentos. B. Fotografía convertida a imagen de 32-bits (escala de grises). C., D. Discriminación del *background*/espacio intercelular utilizando la herramienta *Threshold adjustment tool* y seleccionando el pico correspondiente a las células. E., F.

Aislamiento de neutrófilo con la herramienta *Freehand Tool*. G., H. Discriminación del núcleo utilizando la herramienta *Threshold adjustment tool* y seleccionando el pico correspondiente al citoplasma. (Imagen adaptada de *Flow cytometric quantification of granulocytic alkaline phosphatase activity in unlysed whole blood*<sup>127</sup>).

La discriminación del núcleo es necesaria, pues de lo contrario los resultados obtenidos no son valorables, debido a que el núcleo celular no es el objetivo que se busca cuantificar, y la desviación estándar obtenida puede incrementarse en más de 14 veces como se observa en la siguiente tabla comparando el resultado del análisis de las imágenes obtenidas de a partir de 3 células (**Tabla 2**, columna DesvEst marcada en rojo).

Con la imagen procesada (**Figura 12 H**) se obtuvieron los resultados numéricos con la herramienta *Analyze-measure*. Los valores reportados en el análisis fueron: área, media, desviación estándar, valores mínimos/máximos, mediana, umbral mínimo y máximo. El siguiente paso consistió en normalizar los valores. Para ello fue necesario cuantificar la intensidad de píxel del ruido de fondo de las respectivas imágenes, representado por la intensidad de color del espacio entre células. Se comparó el valor de la mediana del ruido de fondo completo de la imagen (RFC) excluyendo eritrocitos y leucocitos, con el ruido de fondo parcial (RFP), obtenido a partir de la región extracelular colindante de la célula analizada. Esta comparación se realizó con 69 imágenes obtenidas de la misma extensión de una muestra.

#### Sin núcleo (32-bits)

| Célula | Grado | Área  | Media   | DesvEst | Min.    | Max.    | Mediana |
|--------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1      | 0     | 18704 | 171.803 | 5.226   | 160.333 | 183.333 | 172     |
| 2      | 0     | 15806 | 161.760 | 6.155   | 147.667 | 175.667 | 161.667 |
| 3      | 2     | 9473  | 136.257 | 16.456  | 110.333 | 172.333 | 133.333 |

#### Con núcleo (32-bits)

| Célula | Grado | Área  | Media   | DesvEst | Min.  | Max.    | Mediana |
|--------|-------|-------|---------|---------|-------|---------|---------|
| 1      | 0     | 53788 | 111.143 | 73.757  | 0     | 185.333 | 146.667 |
| 2      | 0     | 40733 | 99.631  | 72.305  | 0.000 | 176.667 | 133.333 |
| 3      | 2     | 29546 | 70.658  | 60.475  | 0.000 | 172.333 | 93.000  |

**Tabla 2.** Valores obtenidos de las imágenes de tres granulocitos distintos según el análisis de imagen de 32-bits, incluyendo y excluyendo el núcleo de las células del análisis. Se observa que la diferencia en la desviación estándar puede incrementarse en hasta 14 veces.

El ruido de fondo completo se obtuvo de forma opuesta a como se discriminó. De modo similar a como se ilustra en la **Figura 12 C**, se utilizó el histograma a modo de guía. Se seleccionó el pico correspondiente a la sección más próxima al blanco.

Teniendo en cuenta la variable del ruido de fondo, la fórmula desarrollada para obtener el índice de intensidad de píxel, comparable entre diferentes muestras, fue la siguiente (**Figura 13**):

$$\text{Índice FAG 32bits} = \frac{((\text{mediana RFC } N_1 - \text{mediana célula } N_1) + (\text{mediana RFC } N_x - \text{mediana célula } N_x))}{\frac{N \text{ células}}{256}} \times 100$$

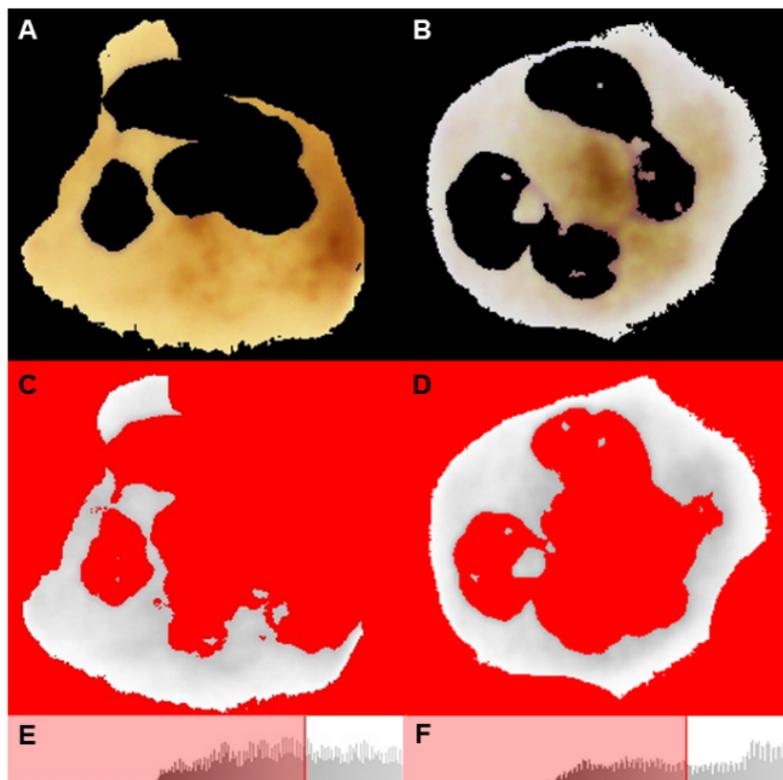
**Figura 13.** Fórmula aplicada para cuantificar la actividad de la enzima con los valores obtenidos del análisis digital utilizando la escala de grises (32-bits). La fórmula se desarrolló como una aproximación de la fórmula utilizada en el método citoquímico, teniendo en cuenta la escala de valores del análisis de imagen (valor máximo 256) y la normalización del número de células analizadas, para las células clasificadas en cada grado de intensidad.

Los métodos estadísticos utilizados en este apartado fueron la prueba de Wilcoxon, Bland-Altman y Kruskal-Wallis, utilizando los programas GraphPad Prism™ Software® y Microsoft® Office Excel.

#### 4.3.5.2 Análisis de imagen en HSB

El análisis en 32-bits presentó una limitación para poder analizar diferentes muestras de forma comparativa. Esta limitación se debe a que la transformación en escala de grises no tiene en cuenta el espectro de colores sino el balance entre el color negro y blanco, de modo que un precipitado con una coloración muy intensa puede generar un valor en escala de grises similar al que producen los núcleos celulares teñidos con hematoxilina. Los colores de los precipitados pueden variar según los sustratos utilizados en la técnica citoquímica; aun así, es esperable que presenten la misma limitación debido a que el análisis de 32-bits tiene en cuenta únicamente la intensidad del color y no el espectro de colores. Por este motivo, se aplicó una variante del análisis de imagen según el modelo de color HSB que contempla los valores del matiz del color, saturación y brillo o

iluminación. Como se puede observar en la **Figura 14**, es posible que no se pueda discriminar el citoplasma del núcleo cuando la actividad fosfatasa alcalina de la célula es muy elevada. Como se muestra tanto en las imágenes **C** y **D** de la **Figura 14**, así como en sus respectivos histogramas (**Figura 14 E, F**) de la escala de grises, la intensidad del precipitado se solapa con la intensidad del núcleo de la célula. Al realizar el análisis de la misma imagen bajo el modelo de color HSB (**Figura 14 A, B**), resulta posible discriminar claramente el citoplasma respecto al núcleo de la célula.

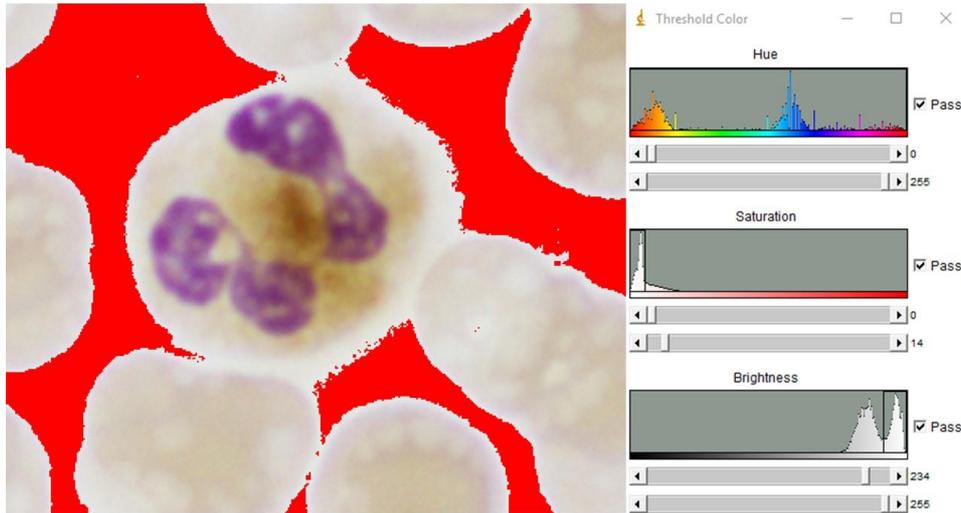


**Figura 14.** Comparación del análisis de imagen de dos células mediante los métodos de conversión a 32-bits y HSB. Discriminación del espacio extracelular y núcleos de 2 neutrófilos de muestras diferentes, mediante el modelo de color HSB (A, B), mediante la conversión de las imágenes a 32-bits (C, D), y los respectivos histogramas de las escalas de grises (E, F), sombreada en rojo la región del histograma correspondiente a la región más oscura de la escala de grises y en rojo en (C) y (D).

El proceso de análisis mediante el modelo HSB, es muy similar al realizado mediante la conversión en 32-bits, prescinde de este paso y permite aplicar directamente la herramienta *Color Threshold* para ajustar las variables del matiz del color, saturación y

brillo (**Figura 15**), y realizar la discriminación sobre las demás células, así como del núcleo respecto del citoplasma de la célula de interés.

Los métodos estadísticos utilizados en este apartado fueron los mismos aplicados en análisis de imagen en 32-bits.



**Figura 15.** Herramienta *Color Threshold* para el procesamiento de las imágenes según el modelo de color HSB. Permite realizar la discriminación de la célula de interés sobre el resto de las células de la imagen, así como del núcleo respecto el citoplasma, evitando la conversión de la imagen a 32-bits y siguiendo un modelo de color (HSB) basado en el sistema visual del ojo humano. El resultado del procesamiento se puede observar en la Figura 25 B.

La fórmula desarrollada para cuantificar el color según el modelo HSB, se basó en la fórmula aplicada en el método citoquímico. Mediante dicha fórmula, se cuantificó de forma inversamente proporcional al valor máximo de 256 de la escala utilizada en el modelo HSB. Los valores obtenidos se aplicaron según los grados de intensidad G1 y G2 en los que se clasificó cada célula individualmente siguiendo el sistema de clasificación del método citoquímico. Sobre estos datos se aplicó la fórmula citoquímica, multiplicando el valor de las células de cada grupo por el número del grado correspondiente. Se descartaron las células clasificadas como grado cero, se multiplicaron por uno los valores de las células clasificadas como grado uno y por dos las clasificadas como grado dos. La clasificación en los diferentes grados de intensidad se realizó según la clasificación visual aplicada en el método citoquímico. Asimismo, se

tuvo en cuenta el porcentaje de las células de cada grado, respecto al número de células totales (Figura 16).

$$\text{Índice HSB} = \left( \left( \frac{\left( \frac{256 - \left( \frac{\sum X_{G1}}{n_{G1}} \right)}{n_{G0+G1+G2}} \right) \times n_{G1}}{256} \right) \times 100 \right) + \left( \left( \frac{\left( \frac{256 - \left( \frac{\sum X_{G2}}{n_{G2}} \right)}{n_{G0+G1+G2}} \right) \times n_{G2}}{256} \right) \times 100 \right) \times 2$$

Figura 16. Fórmula aplicada para cuantificar la actividad de la enzima con los valores obtenidos del análisis digital utilizando el modelo de color HSB. La fórmula se desarrolló como una aproximación de la fórmula utilizada en el método citoquímico, teniendo en cuenta la escala de valores inversa del análisis de imagen (valor máximo 256), el porcentaje de las células de cada grado respecto el total y la normalización de los valores en una escala de 100.

También se aplicó la fórmula del método citoquímico sobre las imágenes tomadas de cada una de las tres muestras, normalizando los valores del número de células analizadas debido a que se obtuvieron menos de 100 imágenes por muestra.

#### 4.4 Cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+ mediante citometría de flujo volumétrica

El recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ en sangre periférica movilizada se realizó siguiendo el método recomendado por la ISHAGE. Las muestras adquiridas en el citómetro Cytomics FC500™, fueron inmediatamente cedidas para este estudio y adquiridas en el citómetro Attune™ NxT, para poder comparar la cuantificación mediante un sistema volumétrico real y mediante microesferas.

#### 4.4.1 Protocolo de adquisición

El protocolo de adquisición empleado en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT, siguiendo las recomendaciones de la ISHAGE, fue el mostrado en la **Figura 17**.

Se estableció el umbral en el canal de fluorescencia del marcador CD45 con el objetivo de discriminar los eventos negativos y restos celulares al marcador panleucocitario. Se seleccionaron las poblaciones leucocitarias en R1 (**Figura 17**) y posteriormente se seleccionaron aquellas positivas para el marcador CD34 con unas características de dispersión lateral de la luz, similares a los linfocitos en R2. Esta misma población, se volvió a enfrentar en un gráfico dual entre la dispersión lateral y el marcador CD45 para discriminar los eventos con una dispersión lateral mayor, y un nivel elevado de expresión de CD45 en R3.

Sobre la población de linfocitos seleccionada sobre el total de eventos en R5, se seleccionó la población según las características de dispersión de la luz en R6, y utilizando la misma ventana de selección sobre la población CD34+ (R3, R4), se obtuvo el recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+.

Paralelamente, en un gráfico enfrentando ambos marcadores, se seleccionaron las microesferas (R8) utilizadas para realizar la cuantificación de progenitores CD34+.

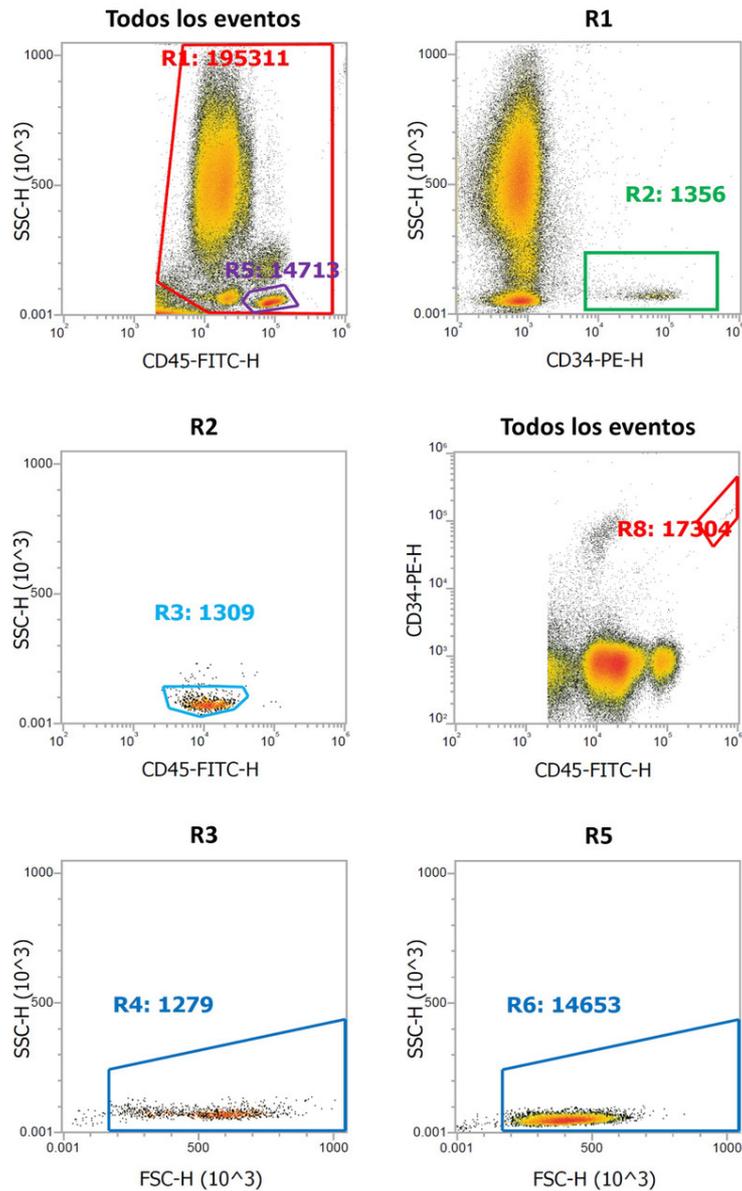


Figura 17. Panel de adquisición utilizado en el citómetro de flujo Attune™ NxT para cuantificar las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ en muestras de sangre periférica movilizada, basado en las recomendaciones del ISHAGE y la utilización de láser verde-amarillo (561 nm) para la excitación de la ficoeritrina (PE). Se seleccionaron las poblaciones CD45 positivas (R1) y la población CD34 positiva con características de dispersión lateral de la luz, similares a los linfocitos (R2). Sobre esta población se discriminaron las células con una mayor expresión del marcador CD45 y dispersión lateral de la luz (R3). Se seleccionaron las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ (R4), seleccionándolas según las características de la dispersión de la luz de los linfocitos de la muestra (R5, R6). En R8 se seleccionaron las microesferas para realizar la cuantificación de las células progenitoras hematopoyéticas CD34+.

#### 4.4.2 Preparación de las muestras

Se utilizaron 55 muestras de sangre periférica y sangre periférica movilizada, anticoagulada con EDTA, procedente de pacientes y donantes sanos a los que se les inyectó factor estimulador de colonias de granulocitos con el fin de movilizar progenitores hematopoyéticos desde la médula ósea a sangre periférica.

Las muestras se prepararon por duplicado en tubos de polipropileno. En primer lugar, se dispensó el volumen de anticuerpos monoclonales (CD34 PE, clon 581, HPCA2; CD45 FITC, clon J33) y seguidamente 100  $\mu$ L de la muestra.

Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Una vez finalizada la incubación, se les añadieron 2 mL de la solución de lisis PharmLyse™ diluida a 1x en agua destilada, se mezcló con las muestras utilizando un agitador a baja velocidad y se volvieron a incubar durante 10 minutos en las mismas condiciones.

Después de la incubación con la solución de lisis, se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de fluoroesferas *Flow Count*™ en agitación a baja velocidad. Seguidamente, se adquirieron las muestras en el citómetro Cytomics FC500™.

La preparación de las muestras fue realizada íntegramente por el personal del Servicio de Hematología del Hospital Universitari Germans Trias y Pujol, siguiendo las recomendaciones del ISHAGE y como se describe a continuación, para así comparar los resultados obtenidos en el recuento clínico, con los recuentos realizados en el citómetro Attune™ NxT.

#### 4.4.3 Análisis de las muestras

Se compararon los resultados de cuantificación de las células CD34+ mediante microesferas y de cuantificación volumétrica real. Las mismas muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo Attune™ NxT, y se obtuvo el recuento de las microesferas en la región R8 (**Figura 17**). El recuento de las células CD34+ se obtuvo de la región R4 (**Figura 17**). La concentración de las células CD34+ se calculó a partir del número adquirido de las mismas (**Figura 17 R4**), el número adquirido de las microesferas

(Figura 17 R8) y, la concentración de las microesferas, indicado en cada vial por el fabricante. Para realizar el cálculo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{células CD34}^+] = \frac{\text{n}^\circ \text{ microesferas}}{\text{concentración microesferas}} \times \text{n}^\circ \text{ células CD34}^+$$

En el citómetro Attune™ NxT también se obtuvo directamente la concentración celular. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución aplicado a la muestra durante su procesamiento. Este factor de dilución proviene de la utilización de 100 µL de muestra diluidos en 2.220 µL durante su preparación (20 µL de anticuerpos, 2 mL de solución de lisis y 100 µL de microesferas).

Los métodos estadísticos utilizados en este estudio fueron la prueba-T para la recta de regresión y el análisis Bland-Altman usando el programa GraphPad Prism Software®.

#### **4.5 Validación de reactivos para su uso en diagnóstico *in vitro***

Este estudio está siendo desarrollado en colaboración con la industria biotecnológica con el objetivo de realizar la validación de anticuerpos monoclonales con marcado CE-IVD.

##### **4.5.1 Protocolos de adquisición**

La estrategia para realizar las evaluaciones de los anticuerpos fue la siguiente: se adquirieron dos tubos en los que la misma muestra había sido incubada con un anticuerpo común, generalmente el marcador panleucocitario CD45, además del anticuerpo de referencia y el anticuerpo a evaluar, manteniendo las mismas condiciones en ambos tubos. En primer lugar, se realizaron los ajustes de la configuración de la adquisición con la muestra incubada con el anticuerpo de referencia. Seguidamente, utilizando exactamente los mismos ajustes, se adquirió la muestra incubada con el anticuerpo a validar.

A partir de esta estrategia, se desarrollaron diferentes protocolos de adquisición adecuados a cada marcador, como los leucocitarios de superficie, intracelulares, marcadores plaquetarios y cadenas Kappa y Lambda, entre otros.

#### **4.5.1.1 Anticuerpos leucocitarios de superficie e intracelulares**

Para las muestras marcadas con anticuerpos leucocitarios, se siguió el siguiente panel de adquisición:

Un gráfico que enfrentase el parámetro tiempo, respecto el FSC-A para verificar que el flujo de la adquisición fue continuo. Simultáneamente, un gráfico enfrentando los parámetros FSC-A y FSC-W para seleccionar la población de singletes.

Seguidamente, un tercer gráfico a partir de la población de singletes, que enfrentase los parámetros FSC-A y SSC-A para discriminar el ruido de fondo.

En un cuarto gráfico, a partir de las poblaciones de leucocitos, se enfrentaron los parámetros SSC-A y el marcador CD45 en el respectivo canal de fluorescencia, para seleccionar la población de células CD45+ y discriminar el ruido de fondo con mayor precisión mediante la fluorescencia.

Sobre esta población CD45+, se generó otro gráfico enfrentando el parámetro SSC-A y el marcador para evaluar, seleccionando la población positiva para el marcador objetivo. Asimismo, se crearon los gráficos necesarios para enfrentar las diferentes fluorescencias empleadas en la adquisición y verificar las compensaciones.

#### **4.5.1.2 Anticuerpos antiplaquetarios**

En las muestras marcadas con anticuerpos antiplaquetarios, se siguió el siguiente panel de adquisición:

Un gráfico enfrentando los parámetros SSC-A y FSC-A en escala logarítmica, para discriminar las plaquetas de las poblaciones leucocitarias y ruido de fondo (**Figura 18**).

Seguidamente un gráfico enfrentando el parámetro SSC-A y el marcador plaquetario a evaluar.

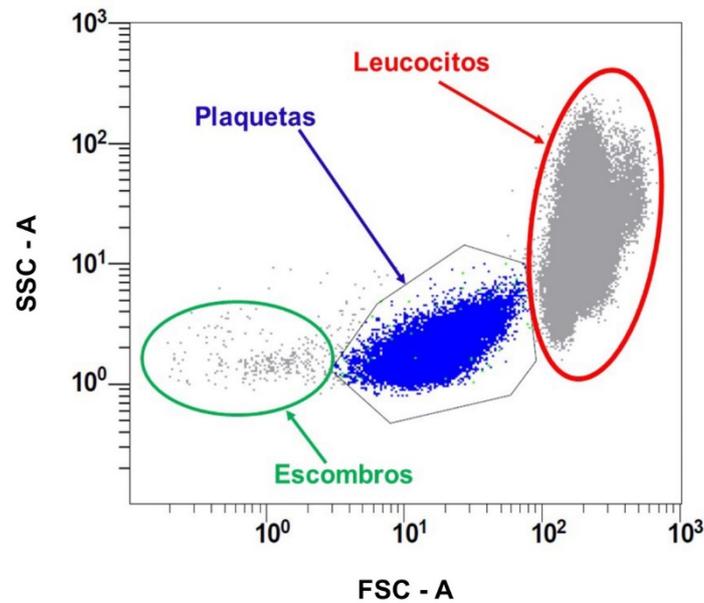


Figura 18. Gráfico de adquisición de plaquetas, leucocitos y eritrocitos según los parámetros de dispersión de la luz. La discriminación de las plaquetas (azul) respecto los leucocitos y eritrocitos (rojo) y micropartículas derivadas de plaquetas (verde) se realizó según sus características de dispersión de la luz. El umbral de detección se configuró en la dispersión lateral de la luz, para evitar perder los eventos de menor tamaño incluidas las plaquetas y micropartículas.

#### 4.5.1.3 Cadenas Kappa y Lambda

En las muestras marcadas con anticuerpos para las cadenas Kappa y Lambda, se siguió el siguiente panel de adquisición:

Un gráfico que representase el parámetro tiempo, respecto el FSC-A para verificar que el flujo de la adquisición fuese continuo. Simultáneamente, un gráfico enfrentando los parámetros FSC-A y FSC-W para seleccionar la población de singletes.

Seguidamente, un tercer gráfico a partir de la población de singletes, que enfrentase los parámetros FSC-A y SSC-A para seleccionar los leucocitos, discriminando una parte de los restos celulares.

En un cuarto gráfico, a partir de las poblaciones de leucocitos, se enfrentaron los parámetros SSC-A y el marcador CD45 en el respectivo canal de fluorescencia, para seleccionar la población de células CD45+ y discriminar de este modo los restos celulares.

Sobre esta población CD45+, se generó otro gráfico enfrentando el parámetro SSC-A y el marcador CD19 o CD20 para seleccionar la población de células B.

Sobre la población de células B, se generó otro gráfico enfrentando las cadenas Kappa y Lambda pudiendo seleccionar y comparar el porcentaje de células B que presentaban cadenas Kappa o Lambda.

#### **4.5.2 Preparación de las muestras**

La base del presente estudio es la evaluación de anticuerpos monoclonales con certificación RUO, para su uso en IVD. En todos los protocolos se marcaron las muestras por duplicado, con el anticuerpo para validar y con el anticuerpo competidor.

Los volúmenes de anticuerpos utilizados por cada tubo fueron los recomendados por el fabricante, y en el caso de no estar indicado se realizó la titulación del anticuerpo para determinar el volumen óptimo. Del anticuerpo para validar siempre se utilizaron 10 µL por ensayo.

Durante la preparación de cada muestra, se cumplimentó una lista de verificación para cada paso del proceso y permitir su trazabilidad.

##### **4.5.2.1 Protocolo de marcaje de superficie**

Para evaluar antígenos presentes en la membrana celular, se añadió el volumen del anticuerpo común en ambos tubos, así como el anticuerpo a validar y el anticuerpo competidor en sus respectivos tubos.

Seguidamente se añadieron 100 µL de muestra mediante pipeteo reverso, se agitaron suavemente por parejas y se incubaron durante 20 minutos protegidos de la luz y a una temperatura entre 18 y 23 °C.

Una vez finalizada la incubación, se añadieron 500 µL de la solución de lisis OptiLyse C™ en cada tubo, se mezcló con un vórtex y se incubaron 10 minutos bajo las mismas condiciones.

Una vez finalizada la incubación se añadieron 500 µL de la solución tampón, se mezcló con un vórtex y se incubaron 5 minutos bajo las mismas condiciones.

Una vez finalizada la incubación se adquirieron las muestras en el citómetro. En el caso de no tener disponible el citómetro, las muestras se almacenaron a 4°C protegidas de la luz y se adquirieron en un periodo de tiempo inferior a las 24 horas.

#### **4.5.2.2 Protocolo de marcaje intracelular**

Para evaluar marcadores presentes en el citoplasma, se añadió el volumen de anticuerpo común en tubos Eppendorf. Seguidamente se depositaron 100 µL de muestra mediante pipeteo reverso, se agitaron mediante vórtex por parejas y se incubaron durante 20 minutos protegidos de la luz y a una temperatura entre 18 y 23 °C.

Una vez finalizada la incubación, se añadió 100 µL del reactivo A (fijador) indicado por el fabricante, se agitó mediante vórtex y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz y a una temperatura entre 18 y 23 °C.

Una vez finalizada la incubación, se dispensó 1 mL de HBSS en cada tubo y se centrifugaron los tubos por microcentrifugación, con un pulso de 10 segundos a 16.000 rcf., se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µL del reactivo B (permeabilizador) indicado por el fabricante, y el volumen correspondiente del anticuerpo competidor y del anticuerpo a validar.

Seguidamente se incubaron los tubos durante 20 minutos protegidos de la luz y a una temperatura entre 18 y 23 °C.

Una vez finalizada la incubación, se volvió a dispensar 1 mL de HBSS a cada tubo, se volvieron a centrifugar, con un pulso de 10 segundos a 16.000 rcf. y, se retiró el sobrenadante. Seguidamente se resuspendieron las células con 1 mL de tampón para citometría y a continuación se transfirieron los volúmenes a tubos de polipropileno de 5 mL.

Seguidamente se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo. En el caso de no tener disponible el citómetro de flujo, se guardaban las muestras en la nevera para adquirirlas en un periodo de tiempo inferior a las 24 horas.

#### **4.5.2.3 Protocolo de marcaje de cadenas Kappa y Lambda**

Este protocolo requirió realizar un doble lavado de las muestras, previo al marcaje con los anticuerpos. También se utilizaron dos anticuerpos comunes: el anticuerpo CD45 para seleccionar los leucocitos y el anticuerpo CD19 o CD20 para seleccionar los linfocitos B.

Se dispensaron 100  $\mu$ L de la muestra en cada tubo Eppendorf y se añadió 1mL de HBSS. Seguidamente se centrifugaron los tubos por microcentrifugación, con un pulso de 10 segundos a 16.000 rcf., se retiró el sobrenadante y se repitió el paso con 1 mL de HBSS. Una vez retirado el sobrenadante, se dispensaron el volumen de anticuerpos (CD45, CD19/20, Kappa y Lambda) y se mezclaron con la muestra con un agitador.

Seguidamente se incubó la muestra durante 20 minutos protegida de la luz y a una temperatura entre 18 y 23 °C.

Una vez finalizada la incubación, se añadieron 500  $\mu$ L de la solución de lisis OptiLyse C™ y se mezcló utilizando un agitador.

Se volvió a incubar la muestra durante 10 minutos en las mismas condiciones.

A continuación, se añadieron 500  $\mu$ L de FACSFlow™, se mezcló utilizando un agitador y se incubó la muestra durante 5 minutos en las mismas condiciones. Después de la incubación, se transfirieron los volúmenes a tubos de polipropileno de 5 mL y se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo. En el caso de no tener disponible el citómetro de flujo, se guardaban las muestras en la nevera para adquirirlas en un periodo de tiempo inferior a las 24 horas.

#### **4.5.2.4 Protocolo de marcaje de plaquetas**

Debido a la proporción de plaquetas respecto al resto de las células presentes en la muestra, se adaptó el protocolo para estos marcadores.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se ajustó el volumen de la muestra a 20.000 plaquetas/ $\mu$ L. En muestras de donantes con recuentos plaquetarios normales, es aproximadamente una dilución 1/10 de la muestra.

Se dispensaron por pipeteo reverso 100  $\mu$ L de la dilución de la muestra necesarios y el volumen especificado del anticuerpo competidor y del anticuerpo para validar en sus respectivos tubos.

Seguidamente se incubó la muestra durante 20 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. A continuación, se añadió 1 mL de tampón de citometría, se mezcló utilizando un agitador y se incubó la muestra durante 5 minutos en las mismas condiciones. Una vez finalizada la incubación se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo.

Cada muestra de plaquetas se procesó por duplicado. Por una parte, las plaquetas activadas y que, por lo tanto, expresan los marcadores CD41 y CD61. Y, por otra parte, las plaquetas sin activar y que por lo tanto no expresan los marcadores, permitiendo determinar el umbral de positividad para el marcador. Para ello, las muestras en las que se querían mantener las plaquetas sin activar, se incubaron a 37 °C, mientras que aquellas muestras en las que se querían activar las plaquetas para detectar la expresión de los marcadores, se incubaron a temperatura ambiente<sup>128</sup>.

### **4.5.3 Análisis de las muestras**

Los resultados se analizaron con los programas de análisis FlowJo™, FCS Express™ 5, JMP y Microsoft® Office Excel.

La compensación de la superposición de los espectros de emisión de fluorescencias se realizó durante el análisis de las muestras. Cabe remarcar que el análisis de las muestras es un punto especialmente importante en la realización de cualquier estudio de citometría de flujo, en este caso, la validación de los anticuerpos IVD, por lo que el análisis se adaptó a cada marcador de interés como se explica a continuación.

Para el análisis de los marcadores de superficie se utilizó la siguiente secuencia: a partir de un gráfico que enfrentó el marcador CD45 y el parámetro de la dispersión lateral de la luz, se seleccionaron las poblaciones leucocitarias. Sobre la población CD45+ se enfrentaron en un nuevo gráfico los parámetros de dispersión frontal y lateral de la luz, discriminando los restos celulares que hubiesen superado el primer cribaje. Seguidamente, se discriminaron los agregados y dobletes enfrentando en un gráfico los

parámetros anchura y área de la dispersión frontal de la luz. Sobre la población de singletes se enfrentaron el marcador de interés y el parámetro de la dispersión lateral de la luz, permitiendo seleccionar la población positiva para la expresión del marcador estudiado.

En el caso del análisis de marcadores de poblaciones celulares específicas y/o minoritarias, teniendo en cuenta cada caso específico, se utilizó el primer gráfico enfrentando la SSC y el marcador CD45 para seleccionar el *clúster* de la población de interés en lugar de todas las poblaciones leucocitarias. Por ejemplo, el caso de células blásticas que presenten una baja expresión del marcador CD45 o no lo expresen y, según sus propiedades de SSC, se ubiquen próximas a los *clústers* de linfocitos y monocitos.

La estrategia de análisis de los marcadores de plaquetas se realizó de forma similar a la estrategia de adquisición, incluyendo la discriminación de agregados y dobletes, tal y como se realizó con los demás marcadores.

En los paneles de análisis de las cadenas Kappa y Lambda se añadió un gráfico más, enfrentando ambos marcadores de las cadenas Kappa y Lambda, a partir de la selección de la población de células B.

En el panel de análisis del marcador CD34, se omitió el uso de las microesferas, debido a que el propósito del análisis era obtener el porcentaje de la población, y no su cuantificación (**Figura 19**).

Los resultados de los análisis se reportaron cumplimentando los informes requeridos con el porcentaje de las poblaciones positivas para cada marcador según el marcador CD45, CD19 o CD20, exceptuando los marcadores plaquetarios.

A partir de los resultados reportados se calculó la diferencia absoluta del porcentaje de la población objetivo obtenido con el anticuerpo para validar y el anticuerpo competidor como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\Delta\% \text{células objetivo} = \% \text{células objetivo (AcMo para validar)} - \% \text{células objetivo (AcMo de referencia)}$$

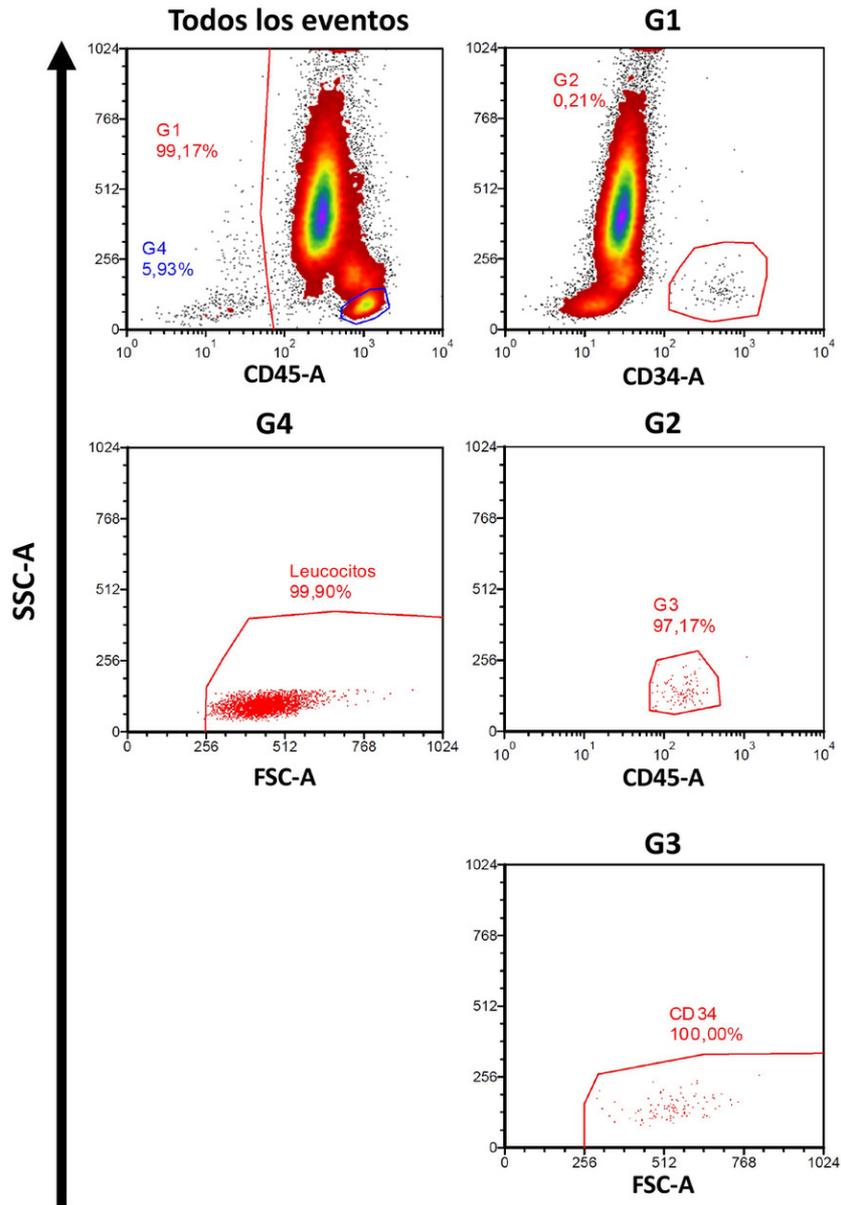


Figura 19. Estrategia de análisis para la validación del anticuerpo CD34. La estrategia de selección de poblaciones y análisis se basa en las recomendaciones de la ISHAGE. No se emplearon la 7-AAD ni microsferas, debido a que el objetivo fue comparar los porcentajes de células CD34+ entre ambos anticuerpos.



## RESULTADOS



**Estudio I: Comparación de la dispersión de la luz y la  
medición de la fluorescencia en la discriminación de  
dobletes**



## Introducción Estudio I



## 1.1 Los dobletes y eventos coincidentes

El doblete, un tipo de evento coincidente, consiste en dos partículas independientes que son interpretadas como una única identidad debido a que atraviesan el punto de interrogación unidas o muy próximas entre ellas<sup>19</sup>.

Algunos autores<sup>129,130</sup> diferenciaron los eventos coincidentes en dos grupos: los *beam coincidences*, en adelante dobletes, de los *pulse processing coincidences* o eventos coincidentes electrónicamente, relacionados con el *dead time* del procesamiento electrónico de los pulsos.

El *dead time* es el intervalo entre que la señal de pulso de salida del preamplificador supera el umbral por primera vez, y el pulso estroboscópico vuelve al cero lógico, lo que representa el tiempo mínimo requerido para procesar un pulso. Este lapso puede variar entre diferentes equipos, con una duración de unos pocos microsegundos. Cuando una segunda célula dispara otro pulso antes de que la señal del primero haya podido ser procesada, es decir, dentro del *dead time*, se produce una coincidencia. Esto causa que la señal de la segunda célula pueda interferir con la señal de la primera, produciendo que los valores de los parámetros del pulso (altura, amplitud y área) no sean representativos de ninguna de las dos células. Frecuentemente, el *dead time* se utiliza como valor indicativo del número de células por segundo que pueden ser analizadas. Por ejemplo, un citómetro con un *dead time* de 15  $\mu$ s, podría analizar 65.000 células/segundo<sup>19</sup>.

Los citómetros de flujo disponen de diferentes sistemas o configuraciones electrónicas propias de cada fabricante para descartar automáticamente la señal coincidente de ambas células. Estas señales descartadas son conocidas como eventos abortados<sup>18,19</sup>. En el caso del citómetro de flujo Attune™ NxT, este dispone de la opción de desactivar este sistema durante la adquisición de la muestra, resultando especialmente útil para poder observar los eventos coincidentes abortados en muestras de elevada concentración celular, o en el estudio de las interacciones célula-célula.

El hecho de que se produzcan estos eventos coincidentes es inevitable debido a que las células no llegan al punto de interrogación en intervalos fijos sino aleatorios. Estos intervalos aleatorios generalmente se ajustan a la distribución de Poisson. A pesar de

que no se pueden eliminar completamente los eventos coincidentes, es posible planificar una tasa de eventos muy por debajo de la tasa de coincidencia del 10% de un instrumento, donde el 90% de las células se pueden clasificar como singletes o células individuales y, limitar el número de células analizadas por unidad de tiempo de acuerdo con el *dead time* del equipo<sup>18,19,131</sup>.

Asimismo, se pueden disminuir estos eventos coincidentes con la preparación y adquisición de las muestras<sup>100</sup>, incluyendo el ajuste de la suspensión para la tasa de análisis adecuada, mediante dilución y filtración de las muestras. Esto se debe a que la filtración de las preparaciones previene y minimiza la adquisición de agregados, así como la formación de obstrucciones que afecten a la disposición de las células fuera del eje de excitación del láser afectando a la discriminación de los agregados celulares<sup>23</sup>.

También se deben tener en cuenta el efecto enjambre o *swarming*, producido cuando debido a la elevada concentración de vesículas de un tamaño pequeño en una muestra, como microvesículas y exosomas, cruzan el haz de luz láser simultáneamente, de manera que las señales individuales de cada vesícula, ya sea de la dispersión de la luz o la fluorescencia, superan el límite de detección del equipo y, en consecuencia, son reconocidas como un único evento. Esto puede causar, por ejemplo, que la concentración determinada por el citómetro de flujo subestime la concentración real, o que las señales fluorescentes de diferentes vesículas que contienen diferentes anticuerpos sean interpretadas como un único evento con diferentes marcadores<sup>132,133</sup>.

Aun asegurando una tasa de eventos adecuada, algunos dobletes y pequeños multipletes pasarán a través del haz de luz láser y se tendrán que discriminar en el análisis, especialmente para la detección de eventos minoritarios.

## **1.2 Discriminación de los dobletes por los parámetros de dispersión de la luz**

Uno de los primeros investigadores en considerar el problema de los dobletes fue Wolfgang Gohde, quien desarrolló la patente denominada *Process for automatic counting and measurement of particles* (US patent #4,021,117A (1975))<sup>134</sup>. Dicha

patente corresponde a un dispositivo de detección con la capacidad de medir los parámetros del pulso amplitud y área durante el conteo automático de partículas y/o células, para evitar errores en la medición causados por la coincidencia<sup>135</sup>. Posteriormente promovió la utilización de los parámetros del pulso altura y área para discriminar los dobletes en los análisis de ADN<sup>18,131</sup>.

El parámetro amplitud, también conocido como tiempo de vuelo, es proporcional al tiempo que tarda una partícula en cruzar el haz de luz láser. El parámetro altura representa la intensidad de la señal y el parámetro área, la integral de los parámetros previos<sup>18</sup>.

Los parámetros del pulso se utilizan para discriminar los dobletes, debido a que estos muestran una mayor señal de los parámetros área o amplitud, frente al parámetro altura, en comparación a las células individuales (singletes)<sup>131</sup>. Representado en un gráfico, se observaría como los dobletes se desvían de la diagonal hacia el parámetro opuesto a la altura (**Figura 20**).

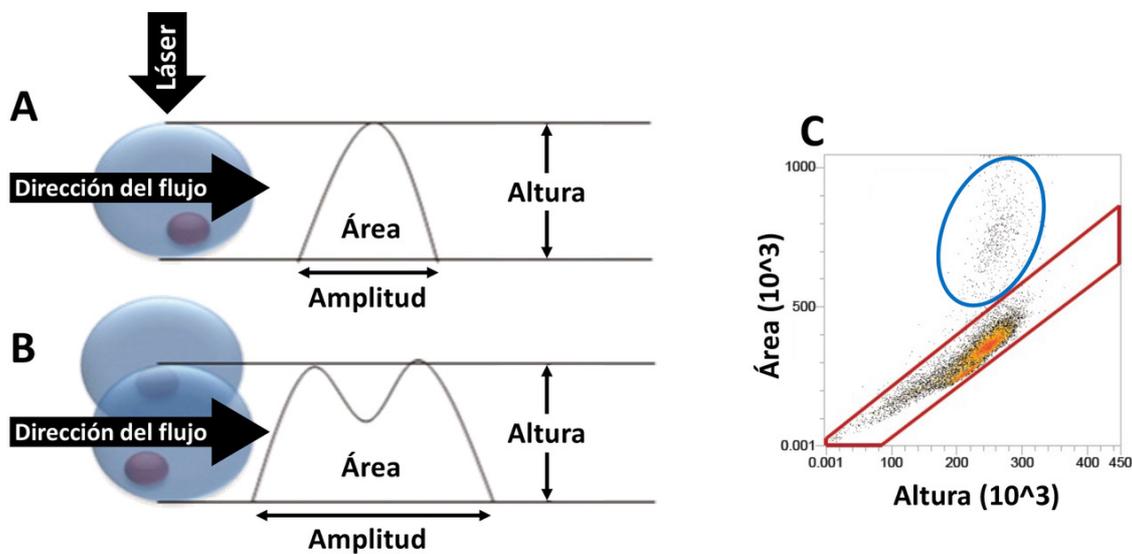


Figura 20. Esquema representativo de los parámetros del pulso (altura, amplitud y área) en la detección de una célula única (A) y de un doblete (B). Gráfico discriminando los singletes (en rojo) y dobletes (en azul) con una proporción mayor del área respecto la altura (C). (Imagen adaptada de *A critical appraisal of factors affecting the accuracy of results obtained when using flow cytometry in stem cell investigations: Where do you put your gates?*<sup>136</sup>).

Tal y como se describe en las recomendaciones para el uso de la citometría de flujo y separación celular en estudios inmunológicos del año 2019<sup>23,131</sup>, el método más habitual para discriminar los dobletes sigue siendo la comparación de los parámetros de pulso altura y área, o amplitud y área, correspondientes al FSC y al SSC<sup>19,23</sup>. También se utiliza la discriminación secuencial, con un primer *dot plot* o *density plot* donde se discriminan los dobletes enfrentando los parámetros altura y amplitud según la dispersión frontal de la luz y secuencialmente según la dispersión lateral de la luz, o viceversa<sup>112,131</sup>.

Estos métodos de discriminación de dobletes en muestras hemáticas, se pueden realizar si previamente se ha preparado la muestra mediante una depleción de los eritrocitos utilizando soluciones eritrolíticas, debido a que la dispersión de la luz de los eritrocitos causa coincidencia con los leucocitos a 488 nm, dificultando su identificación<sup>100</sup>.

### 1.3 Discriminación de dobletes mediante fluorescencia: estudios de ciclo celular y ploidía

En el estudio del ciclo celular los dobletes se producen cuando diferentes núcleos o células, por ejemplo, en la fase  $G_0/G_1$  cruzan el punto de interrogación juntas o muy próximas, de manera que la intensidad de fluorescencia correspondiente a la carga de ADN detectada es similar o equivalente a células en fase  $G_2 + M$ <sup>18,137</sup>.

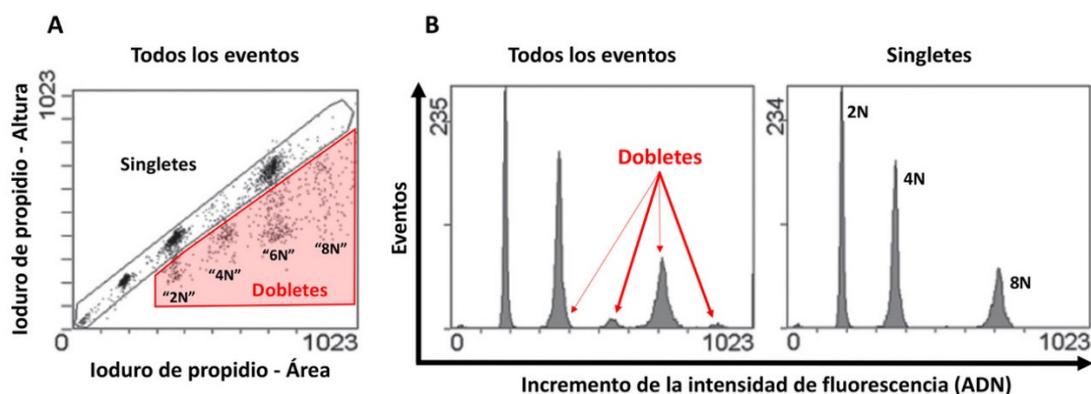


Figura 21. Figura representativa de la discriminación de dobletes en una muestra con células 2N, 4N, 6N y 8N. (A) Discriminación de dobletes mediante un marcador fluorescente de ADN. (B) Los dobletes muestran una intensidad de fluorescencia equivalente a células 2N, 4N, 6N y, 8N en un histograma de eventos e incremento de la intensidad de fluorescencia. (Imagen adaptada de *A rapid and optimization-*

*free procedure allows the in vivo detection of subtle cell cycle and ploidy alterations in tissues by flow cytometry*<sup>138</sup>).

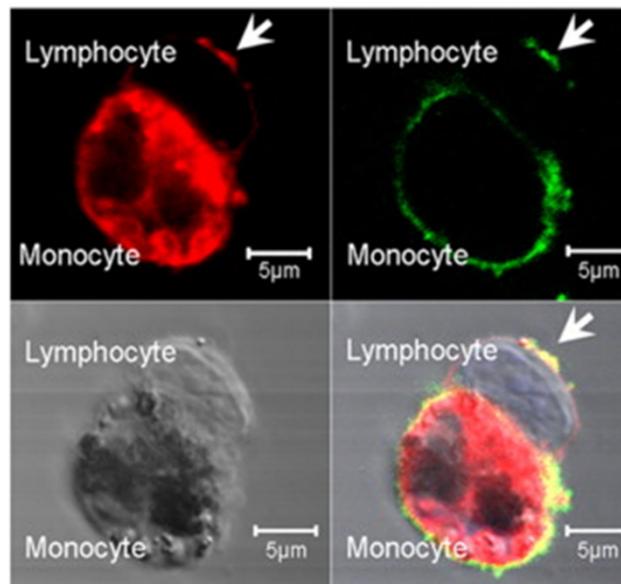
Como referencia, según el modelo matemático presentado por Benson y Brayland<sup>139</sup>, la situación ideal es que el coeficiente de variación (CV) máximo no sea superior al 3% en el pico que corresponde al contenido medio de ADN de la población celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, en el caso de muestras frescas, teniendo en cuenta que el CV será ligeramente superior en muestras parafinadas. También se debe considerar que el CV se relaciona inversamente con la calidad de los datos obtenidos y, por lo tanto, con la calidad de la preparación de la muestra<sup>140,141</sup>. Teniendo en cuenta estos valores de CV como referencia, se puede tener una mejor idea del impacto que causarían las variaciones provocadas por los dobletes, pudiendo cambiar la clasificación de ploidía de diploide/tetraploide<sup>142</sup>, o por ejemplo, afectar al valor pronóstico del porcentaje de células G<sub>2</sub> + M en el cáncer de próstata<sup>143</sup>.

Las estrategias utilizadas para discriminar dobletes de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, con células en fase G<sub>2</sub> + M incluyen el enfrentamiento de los parámetros de fluorescencia del ADN área y altura<sup>144</sup> (**Figura 21**) o la amplitud<sup>23,145</sup>.

Además de la importancia de discriminar los dobletes para los estudios de ciclo celular, existen otras aplicaciones para las cuales es fundamental discriminar correctamente los dobletes. Entre estas aplicaciones podemos contar con el *cell sorting*, en el cual un doblete formado por una célula positiva y otra negativa sería interpretado como una única célula positiva, resultando en una contaminación de la separación celular<sup>146</sup>. También los estudios de ciclo celular y ploidía podrían verse afectados por los dobletes como se ha mostrado anteriormente. Y en los estudios de inmunofenotipo, por ejemplo, podrían interpretarse dos células diferentes como una sola célula positiva para dos marcadores. Asimismo, el efecto de los dobletes en estudios de análisis y detección de poblaciones minoritarias como las células CD34+ o detección de la ERM, entre otras, sería mayor debido a la baja proporción de estas células en la muestra.

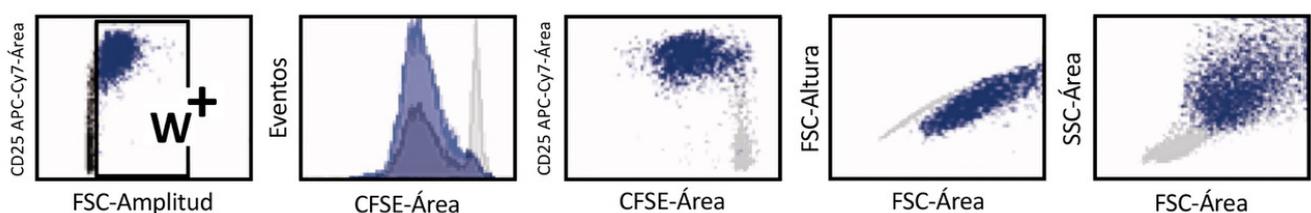
## 1.4 Factores críticos de la discriminación de dobletes mediante dispersión de la luz

Se ha descrito que los dobletes pueden mimetizar a los singletes en cuanto a la amplitud, supuestamente cuando las dos células que conforman el doblete están orientadas en línea o en posición coplanar respecto al haz de luz láser. De tal modo que, al cruzar el haz de luz láser en el mismo instante, el parámetro amplitud sería el mismo que los singletes y la relación altura y área no aumentaría, conduciendo a una exclusión incompleta y detectándolos como células independientes<sup>112,113</sup>. Este caso puede darse en la discriminación de dobletes formados por células T unidas a otras células del sistema inmunitario<sup>112</sup>. En casos muy excepcionales, estas exclusiones incompletas de los dobletes podrían conducir a conclusiones erróneas sobre la existencia de poblaciones que expresan simultáneamente marcadores de linajes diferentes y excluyentes. Así como en el caso del fenómeno de trogocitosis, en el cual se produce una transferencia de fragmentos de la membrana plasmática de una célula a otra y, está asociado a la inducción y regulación de la respuesta inmunitaria<sup>147-149</sup> (**Figura 22**).



**Figura 22.** Transferencia del ILT2 (Ig-Like Transcript 2) de monocitos a linfocitos mediante el fenómeno de trogocitosis. En verde el receptor de ILT2/Leukocyte Ig-Like Receptor (LIR1); en rojo la membrana de los monocitos. (Imagen adaptada de *Proper regrafting of Ig-Like Transcript 2 after trogocytosis allows a functional cell-cell transfer of sensitivity*<sup>148</sup>).

Otro aspecto importante relacionado con los parámetros de dispersión de la luz reside en la identificación de la activación y proliferación de los linfocitos T<sup>150</sup>. De hecho, la activación de las células T está asociada a un aumento en la dispersión frontal de la luz, debido al aumento del volumen celular. Cabe mencionar que la dispersión de la luz se puede predecir en función del tamaño del objeto a una longitud de onda dada según la teoría de Fraunhofer<sup>151</sup>. Sin embargo, esta teoría no considera el índice de refracción, absorción y reflexión entre una partícula y el medio, por lo que es adecuada en el caso de partículas mayores que la longitud de onda y ángulos de dispersión iguales o inferiores a 30°. En cambio, la teoría de Mie<sup>152</sup> incluye el efecto en la dispersión, de la refracción, reflexión y absorción de la luz, resultando más precisa para partículas de menor tamaño. En otro estudio, Ralph M. Böhmer y colaboradores demostraron, por una parte, que la blastogénesis de las células T activadas por antígeno causa un incremento en la amplitud de la señal FSC que permite discriminar y cuantificar las células proliferantes sin marcar. Y, por otra parte, que las células T proliferantes ocupan la misma región que los dobletes y por tanto serían excluidas como tales<sup>153</sup>. A pesar de ello, el sistema descrito sí sería compatible con la aproximación demostrada en este estudio, pues no discrimina los dobletes según los parámetros de dispersión de la luz, referentes al tamaño y complejidad celular, sino por la intensidad de fluorescencia relativa al ADN de cada célula (**Figura 23**).



**Figura 23.** Relación entre la división celular y la transición a propiedades modificadas de la FSC. Las células con una mayor expresión de CD25 mostraron un incremento de la señal FSC-Amplitud (W+, en azul). La dilución de CFSE reveló una proporción de células que se habían dividido al menos una vez (D+), y los perfiles de dispersión de la luz mostraron una proporción creciente que era W+ con un aumento de FSC-Área/Altura. (Imagen adaptada de *Forward light scatter is a simple measure of T-cell activation and proliferation but is not universally suited for doublet discrimination*<sup>153</sup>).

Otro punto para tener en cuenta es la necesidad de lisar los eritrocitos para minimizar la coincidencia con los leucocitos y discriminar los dobletes mediante parámetros de dispersión de la luz, sin diluir las muestras.

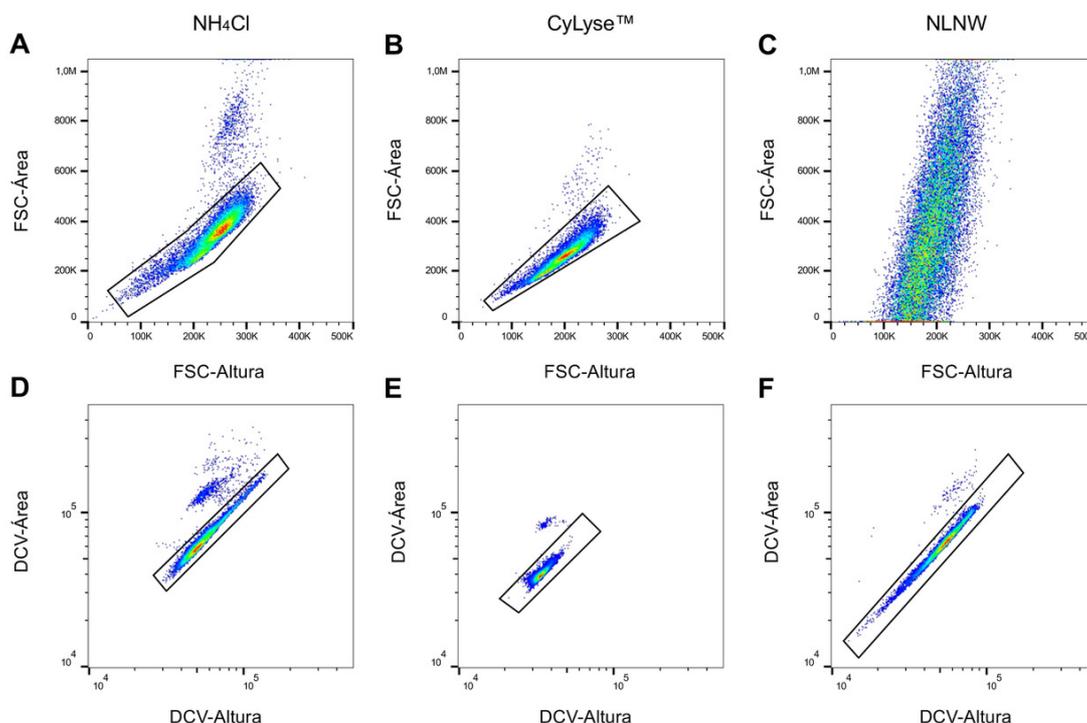
A pesar de que las soluciones de lisis se utilizan en un gran número de estudios de citometría de flujo, estas pueden afectar a las mediciones sobre la dispersión de la luz<sup>154,155</sup>. Esto es debido a que ésta se ve afectada por múltiples factores, como el índice de refracción entre el medio intra y extracelular, por ejemplo, por alteraciones en la integridad de la membrana plasmática. Otros factores que también afectan a la dispersión de la luz son la estructura interna de la célula, su forma y orientación y la presencia de materiales que absorben la longitud de onda incidente<sup>100</sup>. Por lo tanto, la aplicación de métodos que eviten la lisis, como los métodos de mínima manipulación de la muestra, evita estos factores que pueden afectar a la dispersión de la luz.

## Resultados Estudio I



## 2.1 Discriminación de dobletes: dispersión de la luz vs. fluorescencia

Se compararon el método de discriminación de agregados y dobletes basados en los parámetros del pulso (área y altura) de la dispersión frontal de la luz, con el uso de sondas fluorescentes (DCV/Ho342) para el ADN, bajo tres condiciones experimentales diferentes. Las tres condiciones fueron: mínima manipulación de la muestra (NLNW, *No Lyse No Wash*) (**Figura 24 C, F**), lisis con el kit CyLyse™ basado en formaldehído (FH) (lisis sin lavado) (**Figura 24 B, E**) y lisis con una solución de cloruro de amonio (lisis con lavado) (**Figura 24 A, D**).

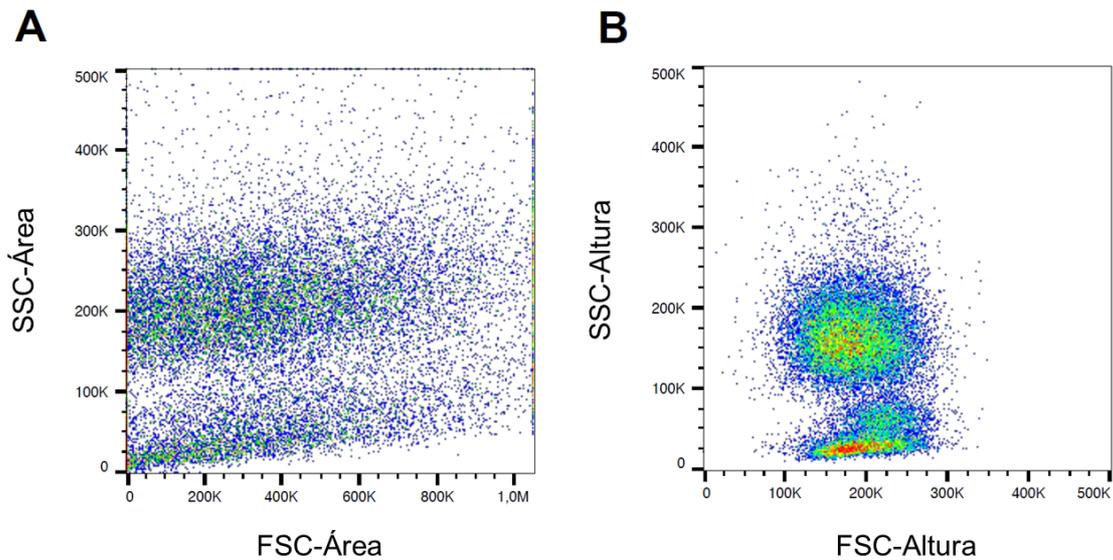


**Figura 24.** Discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz y fluorescencia. En la primera fila se muestran los *density plot* para la discriminación de dobletes según los parámetros del pulso Altura vs. Área de la dispersión frontal de la luz, utilizando (A) la solución de lisis no fijadora de cloruro de amonio, (B) CyLyse™, una solución de lisis que contiene formaldehído, un reactivo fijador que no requiere de un paso de lavado, y (C) sin aplicar ninguna solución de lisis ni proceso de lavado. En la segunda fila se muestran los *density plot* para la discriminación de dobletes según los parámetros del pulso Altura vs. Área de la fluorescencia del ADN detectada por el marcaje con DCV, utilizando los mismos procesos de lisis y no lisis de la fila superior: (D) cloruro de amonio, (E) CyLyse™, y (C) mínima manipulación de la muestra.

Los métodos que incluyeron la lisis de los eritrocitos proporcionaron una dispersión de la luz suficientemente preservada para realizar la discriminación de los dobletes en muestras de donantes sanos, y el método basado en fluorescencia, una preservación óptima del pulso de fluorescencia. Por el contrario, la dispersión frontal de la luz se vio altamente degradada al utilizar los métodos de mínima manipulación de la muestra (**Figura 24 C**), dificultando la discriminación de los dobletes al utilizar los parámetros de dispersión de la luz bajo las condiciones de mínima manipulación de la muestra y sin diluir la muestra, debido a la coincidencia de los eritrocitos con los leucocitos al pasar el punto de interrogación. Por lo tanto, la discriminación de los dobletes utilizando los parámetros de dispersión de la luz bajo estas condiciones experimentales, fue posible en las muestras en las que se lisaron los eritrocitos (**Figura 24 A, B**). Las ratios de los singletes obtenidas tanto para la concentración como el porcentaje entre ambos métodos de discriminación de agregados, fue de 1,004 al procesar las muestras con la solución de cloruro de amonio y de 1,003 con la solución CyLyse™.

El método basado en el marcaje fluorescente del ADN permite realizar la discriminación de los dobletes sin necesidad de diluir la muestra, lisar los eritrocitos o discriminarlos por la diferencia de absorbancia de la oxihemoglobina a la luz azul y violeta y, minimizando a la vez la manipulación sobre la muestra. El motivo de discriminar los eritrocitos se debe a que estos normalmente se encuentran en una proporción 700:1 respecto a los leucocitos, causando coincidencia con estos cuando se utiliza una fuente de luz de 488 nm. También cabe destacar que el método basado en el marcaje fluorescente del ADN, en comparación al método basado en la dispersión de la luz, facilita la identificación de los *clústeres* de dobletes y singletes y, por lo tanto, una selección más precisa de los singletes, incluso en muestras no patológicas.

Al estudiar las propiedades de la dispersión de la luz en muestras que no han sido sometidas a la lisis de eritrocitos y han sido adquiridas discriminando los eritrocitos mediante el uso de un marcador fluorescente, es más adecuado utilizar el parámetro Altura (**Figura 25 B**) en lugar del parámetro Área (**Figura 25 A**), debido a que, aunque han sido discriminados en la adquisición, estos estaban presentes en la muestra adquirida y por lo tanto contribuyen al parámetro Área del pulso<sup>100</sup>.



**Figura 25.** Contribución de los eritrocitos en el parámetro Área del pulso de la dispersión de la luz en muestras no lisadas y adquiridas a alta velocidad, en las que los eritrocitos fueron discriminados mediante marcaje fluorescente. (A) *Density plot* mostrando la dispersión de la luz de células nucleadas según el parámetro Área del pulso, en una muestra de sangre periférica no lisada. Se muestra que el parámetro Área del pulso no es adecuado para muestras sin lisar debido a la contribución de los eritrocitos a este parámetro. (B) *Density plot* mostrando la dispersión de la luz de células nucleadas según el parámetro Altura del pulso, en la misma muestra de sangre periférica. Se muestra que el parámetro Altura es más preciso para representar muestras de sangre no lisada.

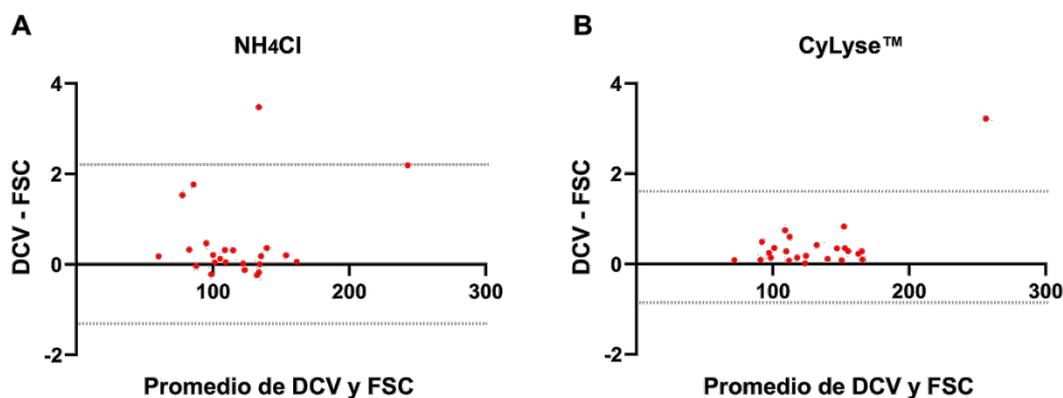
También se compararon las concentraciones celulares de los singletes obtenidas después de la discriminación de dobletes según los diferentes métodos (dispersión de la luz y fluorescencia) y condiciones (mínima manipulación de la muestra, lisis sin lavado, lisis con lavado), en 24 muestras de donantes sanos.

La discriminación de dobletes mediante la dispersión de la luz se realizó en las muestras sometidas a la lisis de eritrocitos con la solución basada en cloruro de amonio y formaldehído.

Para realizar las comparaciones se utilizó el análisis Bland-Altman. En este, para cada comparación, se representó la concentración celular promedio de las dos mediciones (células/ $\mu\text{L}$ ) (eje X), frente a la diferencia entre las concentraciones celulares obtenidas para cada medición emparejada (eje Y) (**Figura 26**). El intervalo de confianza (IC) del 95%

fue determinado con el promedio  $\pm 1,96$  veces la desviación típica de la diferencia entre los dos métodos a comparar.

Ambos métodos mostraron acuerdo con las muestras tratadas con la solución de cloruro de amonio (sesgo = 0,46; 95% IC = -1,3 a 2,2) y con la solución formaldehído (sesgo = 0,41; 95% IC = -0,8 a 1,7). El método basado en fluorescencia ayudó a detectar más singletes en comparación al método basado en la dispersión de la luz (**Figura 26**).



**Figura 26.** Gráficos Bland-Altman para comparar los métodos de discriminación de dobletes en n=24 muestras de sangre periférica de donantes sanos. Se representa el promedio de la concentración celular de la población de células únicas obtenida con el método de marcaje fluorescente del ADN y con la dispersión frontal de la luz, contra la diferencia entre la concentración obtenida por ambos métodos, en las muestras tratadas con (A) cloruro de amonio (sesgo = 0,46; 95% IC = -1,3 a 2,2) y (B) CyLyse™ (sesgo = 0,41; 95% IC = -0,8 a 1,7), para la lisis de los eritrocitos.

También se observó concordancia al comparar las concentraciones obtenidas bajo las diferentes condiciones de lisis y no lisis y utilizando el método basado en la dispersión de la luz y la fluorescencia (**Figura 27**). Las concentraciones celulares obtenidas con la condición de mínima manipulación de la muestra fueron superiores a las obtenidas con el método de lisis y lavado (**Figura 27 C**).

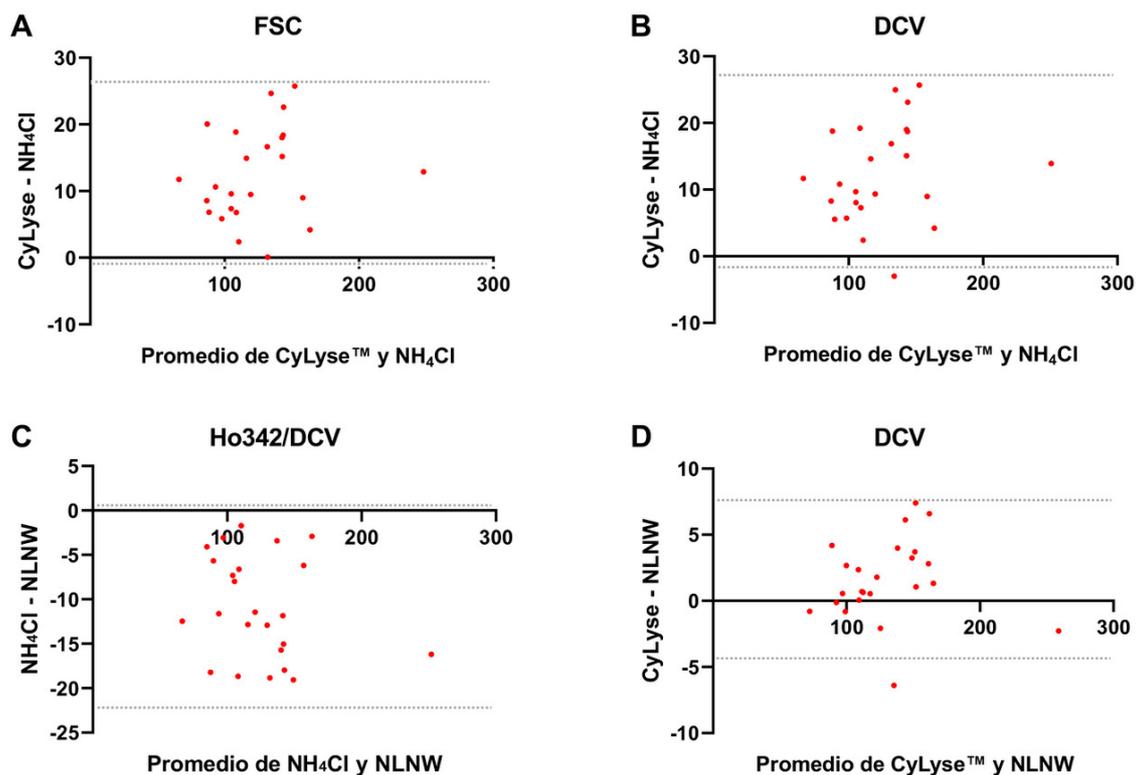
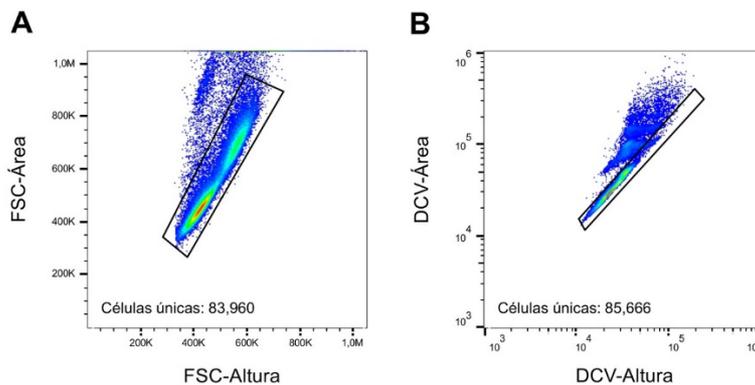


Figura 27. Gráficos Bland-Altman para la comparación de los métodos de discriminación de dobletes entre diferentes condiciones experimentales utilizando  $n=24$  muestras de sangre periférica de donantes sanos. Se representa el promedio de la concentración celular de la población de células únicas obtenidas bajo condiciones experimentales diferentes, contra la diferencia entre las concentraciones celulares. (A) Comparación de células individuales obtenidas por el método de dispersión de la luz utilizando las soluciones CyLyse™ y cloruro de amonio (sesgo = 12,51; 95% IC = -1,2 a 26,3). (B) Comparación de células individuales obtenidas por el método de marcaje fluorescente del ADN utilizando las soluciones CyLyse™ y cloruro de amonio (sesgo = 12,46; 95% IC = -1,9 a 26,9). (C) Comparación de células individuales obtenidas por el método de marcaje fluorescente del ADN utilizando la solución de cloruro de amonio y sin realizar lisis ni lavado (sesgo = -10,90; 95% IC = -22,3 a 0,5). (D) Comparación de células individuales obtenidas por el método de marcaje fluorescente del ADN utilizando la solución CyLyse™ y sin realizar lisis ni lavado (sesgo = 1,56; 95% IC = -4,4 a 7,6).

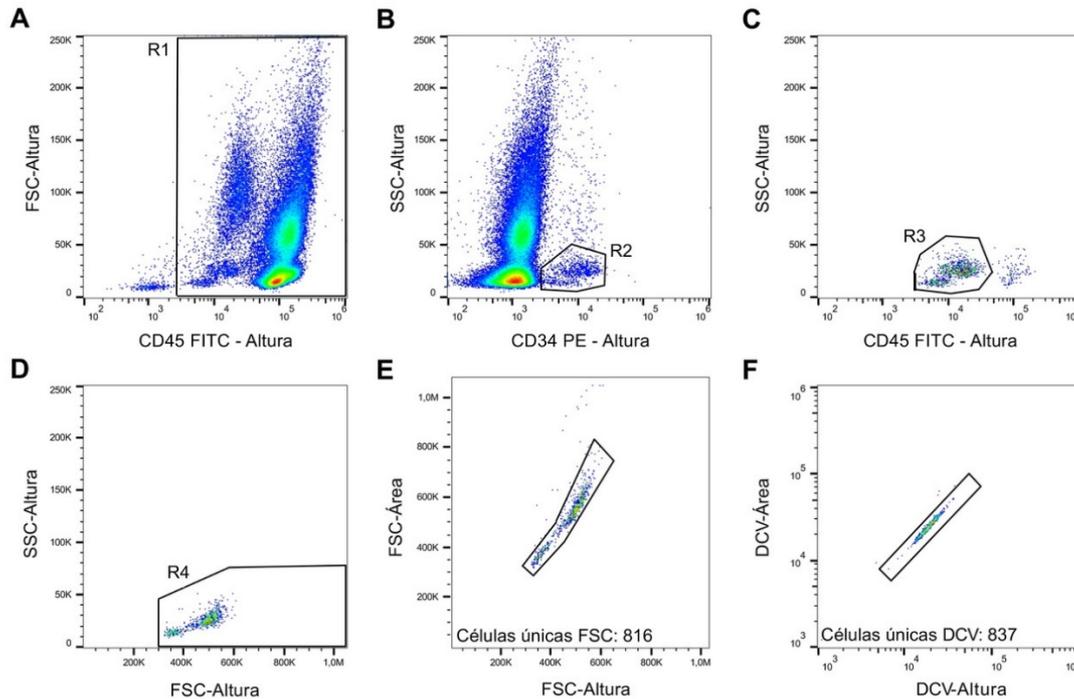
## 2.2 Discriminación de dobletes en productos con elevada celularidad

El uso de sondas fluorescentes de ADN para la discriminación de dobletes, en comparación a los métodos basados en la dispersión de la luz, facilita la discriminación de estos especialmente en muestras de elevada celularidad, en la detección de poblaciones de células raras y/o minoritarias y en estudios de ERM, entre otras.

En muestras con una elevada celularidad y que pueden presentar un elevado número de agregados, como, por ejemplo, muestras de producto de leucoaféresis, el método de discriminación de dobletes basado en la dispersión de la luz identificó erróneamente algunas de estas células como dobletes debido a la coincidencia por la elevada celularidad (**Figura 28 A**) o formación de agregados con, por ejemplo, células CD34+ (**Figura 29 E**). Sin embargo, el método basado en el uso de sondas fluorescentes de ADN permitió discriminar los dobletes a pesar de la elevada celularidad, sin necesidad de diluir la muestra (**Figura 28 B**) e independiente de las características de dispersión de la luz de las células permitiendo, por ejemplo, en la discriminación de los dobletes sin excluir las células CD34+ en muestras de sangre periférica movilizada (**Figura 29 F**). Cabe mencionar que dicha discriminación de dobletes se realizó sobre la población de interés para facilitar la identificación de estos (**Figura 29 F**), proporcionando una ratio de número de eventos de singletes entre ambos métodos de discriminación de agregados, superior a 1 (1,026).



**Figura 28. Comparación de la discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz y fluorescencia en una muestra con elevada celularidad. Discriminación de dobletes en una muestra de producto de leucoaféresis utilizando (A) los parámetros del pulso Área vs. Altura de la dispersión frontal de la luz, y (B) los parámetros del pulso Área vs. Altura de la fluorescencia del ADN detectada por el marcaje con DCV. La estadística mostrada en los gráficos corresponde al número de células dentro de la región.**



**Figura 29.** Comparación de la discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz y fluorescencia en una muestra de sangre periférica movilizada para el recuento de células CD34+. (A - D) Estrategia de análisis para contar células progenitoras hematopoyéticas CD34+ (R4) basado en las recomendaciones de la ISHAGE. (E) Discriminación de dobletes sobre células CD34+ según los parámetros de dispersión de la luz y, (F) de la fluorescencia. La estadística mostrada en los gráficos corresponde al número de células dentro de la región.

### 2.3 Eliminación de eventos coincidentes por hardware durante la adquisición

Adicionalmente, se adquirieron las n=24 muestras de sangre periférica incluyendo los eventos coincidentes y se comparó la concentración celular obtenida después de la discriminación de dobletes con la obtenida con la exclusión de los eventos coincidentes (Figura 30).

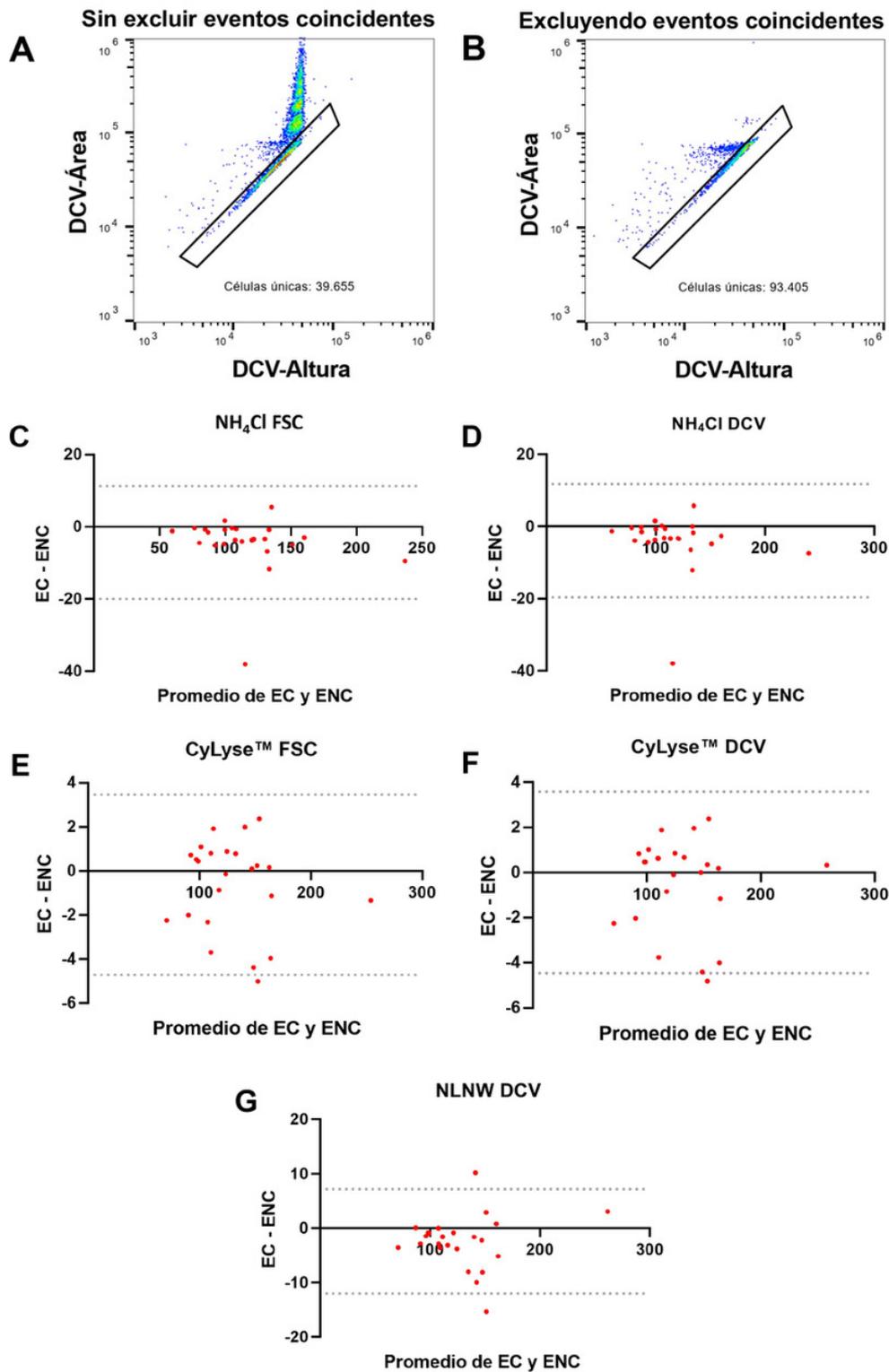


Figura 30. Discriminación de dobletes con la opción de no excluir los eventos coincidentes (EC) y, excluyéndolos (NCE). (A y B) *Density plot* representativos de la discriminación de dobletes según los parámetros de la fluorescencia sin excluir los eventos coincidentes (A) y excluyendo los eventos coincidentes (B). La estadística mostrada en los gráficos corresponde al porcentaje de células individuales respecto los eventos totales adquiridos. (C – G) Gráficos Bland-Altman para la comparación de la concentración celular para todas las condiciones experimentales y estrategias de discriminación

de dobletes sin excluir y excluyendo los eventos coincidentes. (C) Comparación para las muestras lisadas con cloruro de amonio y utilizando el método de discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz (sesgo = -4,44; 95% IC = -20,1 a 11,2). (D) Comparación para las muestras lisadas con cloruro de amonio y utilizando el método de discriminación de dobletes según fluorescencia (sesgo = -4,02; 95% IC = -19,7 a 11,7). (E) Comparación para las muestras lisadas con CyLyse™ y utilizando el método de discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz (sesgo = -0,63; 95% IC = -4,7 a 3,5). (F) Comparación para las muestras lisadas con CyLyse™ y utilizando el método de discriminación de dobletes según fluorescencia (sesgo = -0,45; 95% IC = -4,5 a 3,6). (G) Comparación para las muestras no lisadas y utilizando el método de discriminación de dobletes según fluorescencia (sesgo = -2,44; 95% IC = -12,0 a 7,1).

En la **Figura 30** se muestran la discriminación de dobletes basada en la fluorescencia del marcador de ADN en una muestra de sangre periférica sin excluir los eventos coincidentes (**Figura 30 A**) y excluyéndolos (**Figura 30 B**) donde se puede visualizar los eventos descartados por el sistema de aborto electrónico. Al comparar las muestras lisadas con cloruro de amonio el sesgo fue de -4,44 cuando se discriminaron los dobletes según los parámetros de dispersión de la luz (**Figura 30 C**) y de -4,02 cuando se discriminaron según la fluorescencia del marcador de ADN (**Figura 30 D**), indicando una mayor concentración celular en los singletes al eliminar los eventos coincidentes, mediante la opción de no excluir los eventos coincidentes. En las muestras lisadas con CyLyse™ el sesgo fue próximo a cero en ambos casos; -0,63 al discriminar los dobletes según los parámetros de dispersión de la luz (**Figura 30 E**) y de -0,45 según la fluorescencia del marcador de ADN (**Figura 30 F**). Y las muestras en las que no se aplicó ninguna solución de lisis ni lavado y, por lo tanto, la discriminación de dobletes se realizó según la fluorescencia del marcador de ADN, el sesgo fue de -2,44 (**Figura 30 G**) indicando nuevamente una mayor concentración celular en los singletes cuando se descartaron los eventos coincidentes mediante la opción de no excluir los eventos coincidentes.

## 2.4 Discriminación de dobletes en los citómetros Attune™ y Attune™ NxT

Con posterioridad a la comparación de los valores obtenidos de concentración celular de singletes, con la opción de descartar los eventos coincidentes habilitada y sin habilitar, se compararon los valores obtenidos entre ambos citómetros de flujo, al realizar la discriminación de dobletes según la dispersión de la luz y fluorescencia y en las diversas condiciones experimentales de lisis con lavado, lisis sin lavado y mínima manipulación de la muestra.

En las muestras lisadas con la solución de cloruro de amonio se observó una mayor concentración celular en los singletes al adquirir las muestras en el citómetro de flujo Attune™ NxT, respecto el Attune™, independientemente de utilizar el método basado en fluorescencia (sesgo = -10,85; 95% IC = -24,6 a 2,9) (**Figura 31 A**) o en dispersión de la luz (sesgo = -13,34; 95% IC = -28,3 a 1,7) (**Figura 31 C**).

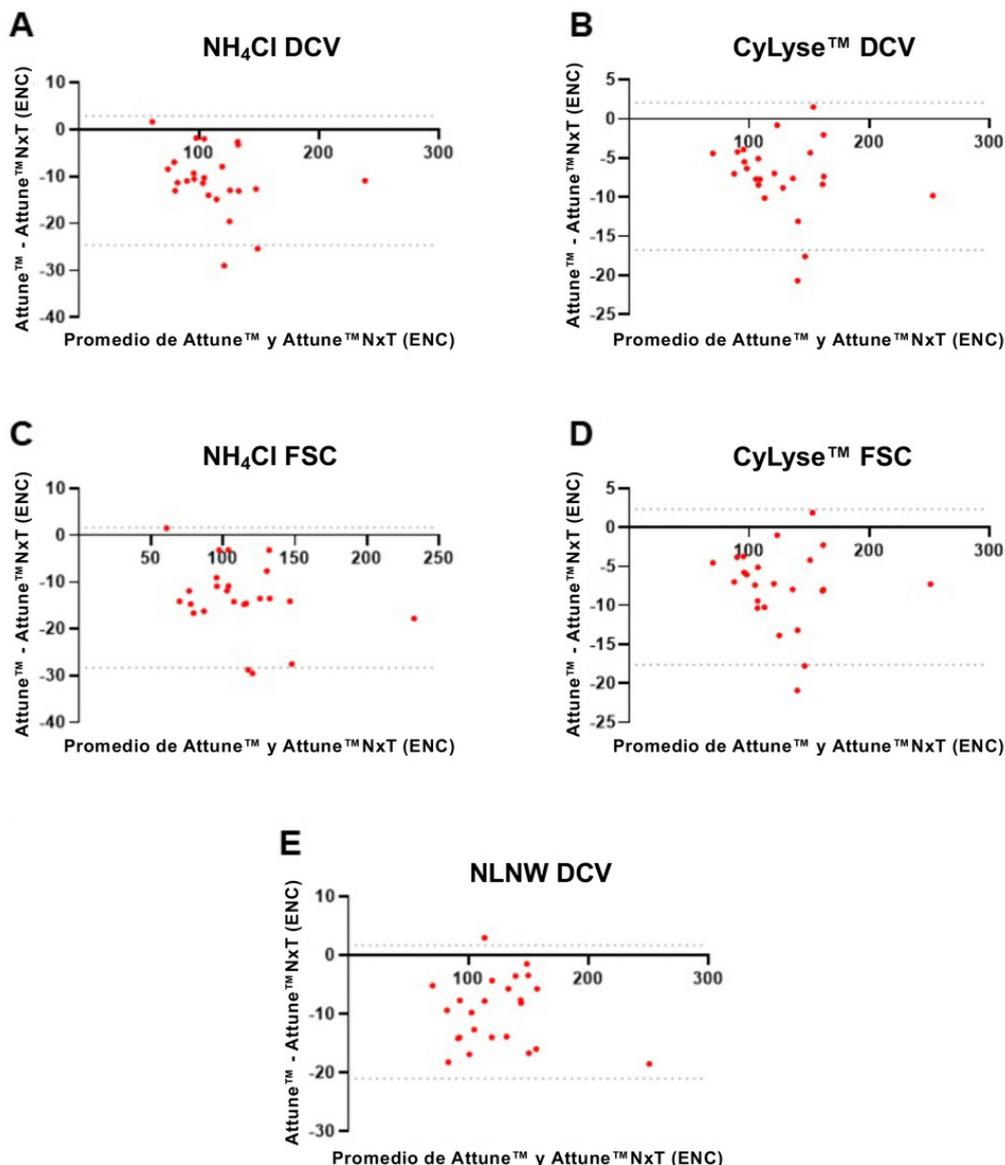


Figura 31. Gráficos Bland-Altman para la comparación de la concentración celular obtenidas en los citómetros Attune™ y Attune™ NxT para todas las condiciones experimentales y estrategias de discriminación de dobletes excluyendo los eventos coincidentes. (A) Comparación para las muestras lisadas con cloruro de amonio y utilizando el método de discriminación de dobletes según fluorescencia (sesgo = -10,85; 95% IC = -24,6 a 2,9). (B) Comparación para las muestras lisadas con CyLyse™ y utilizando el método de discriminación de dobletes según fluorescencia (sesgo = -7,35; 95% IC = -16,8 a 2,1). (C) Comparación para las muestras lisadas con cloruro de amonio y utilizando el método de discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz (sesgo = -13,34; 95% IC = -28,3 a 1,7). (D) Comparación para las muestras lisadas con CyLyse™ y utilizando el método de discriminación de dobletes según los parámetros de dispersión de la luz (sesgo = -7,63; 95% IC = -17,6 a 2,3). (E) Comparación para las muestras no lisadas y utilizando el método de discriminación de dobletes según fluorescencia (sesgo = -9,63; 95% IC = -21 a 1,7).

Se observaron resultados similares al utilizar la solución CyLyse™ en el método basado en fluorescencia (sesgo = -7,35; 95% IC = -16,8 a 2.1) (**Figura 31 B**) y dispersión de la luz (sesgo = -7,63; 95% IC = -17,6 a 2.3) (**Figura 31 D**). No obstante, las diferencias en la concentración celular fueron menores respecto las muestras preparadas con la solución de cloruro de amonio (**Figura 31 A, C**).

En el caso de las muestras lisadas tanto con la solución de cloruro de amonio, como con la solución CyLyse™ (**Figura 31 A - D**), las diferencias en la concentración celular se vieron incrementadas en las muestras con mayor concentración celular, por el contrario, estas diferencias según la concentración celular, no se observaron en las muestras en las que se aplicó el método de mínima manipulación de la muestra (sesgo = -9,63, 95% IC = -21 a 1,7) (**Figura 31 E**).

## **2.6 Efecto de las soluciones de lisis de eritrocitos sobre las poblaciones leucocitarias**

Se comparó la discriminación de dobletes entre las muestras lisadas y sin lisar, siguiendo el método basado en fluorescencia (**Figura 32**). Las comparaciones no mostraron diferencias significativas en términos de concentración celular en los singletes (ANOVA) al discriminar los dobletes en muestras de sangre periférica de donantes sanos. Sin embargo, las comparaciones por pares entre las muestras lisadas con cloruro de amonio y las muestras sin lisar mostraron una pendiente inferior a uno (pendiente = 0,92; 95% IC = 0,90 a 0,94; P-valor < 0,0001) indicando que esta solución de lisis eritrocitaria causó también depleción leucocitaria. En cambio, cuando se utilizó la solución CyLyse™ la pendiente resultante fue próxima a uno (pendiente = 1,01; 95% IC = 1,00 a 1,02; P-valor < 0,0001). Estos resultados en conjunto indican que la mayor pérdida de leucocitos fue causada por el lavado de las muestras.

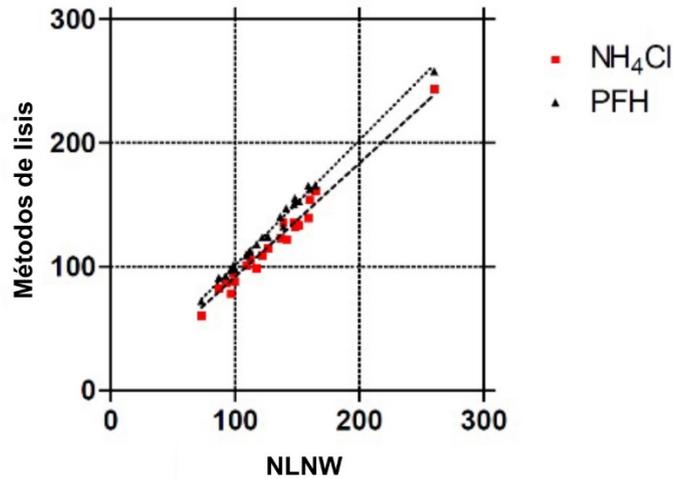


Figura 32. Regresión lineal de la discriminación de dobletes basado en la fluorescencia del ADN comparado entre muestras lisadas y sin lisar. Las células individuales seleccionadas por los parámetros Área y Altura de la fluorescencia del marcador DCV se comparó por regresión lineal entre muestras sin lisar y muestras lisadas con cloruro de amonio y CyLyse™. Para las muestras lisadas con cloruro de amonio, la pendiente de 0,91 (P-valor < 0,0001; 95% IC = 0,90 a 0,94), indicando una pérdida celular en comparación a las muestras no lisadas. Para las muestras lisadas con CyLyse™, la pendiente fue de 1,01 (P-valor < 0,0001; 95% IC = 1,00 a 1,02).



**Estudio II: Cuantificación de la actividad fosfatasa  
alcalina granulocitaria mediante citometría de flujo**



## Introducción Estudio II



## 1.1 La Fosfatasa Alcalina granulocitaria

La fosfatasa alcalina granulocitaria es una proteína de membrana plasmática con la capacidad de hidrolizar monoésteres de ácido fosfórico en pH alcalino. Fue descrita por primera vez en 1907 por Suzuki y colaboradores<sup>156</sup> y su presencia en los leucocitos fue sugerida por Kay en 1929<sup>157</sup>. Se conocen cuatro isoformas de fosfatasa alcalina (TNAP, *Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase/liver-bone-kidney type*; PLAP, *PLacental Alkaline Phosphatase*; GCAP, *Germ Cell Alkaline Phosphatase*; y IAP, *Intestinal Alkaline Phosphatase*) clasificadas según el gen por el que son codificadas (*ALPL*, *ALPP*, *ALPP2* i *APL1* respectivamente) y nombradas según su localización de expresión<sup>158,159</sup>.

La fosfatasa alcalina granulocitaria se incluye en el grupo de la isoforma TNAP y, la denominación de fosfatasa alcalina leucocitaria se debe a que esta isoforma se sobreexpresa en los granulocitos<sup>160</sup>. Siendo Gomori el primer investigador en demostrar que la fosfatasa alcalina leucocitaria se encuentra en estas células<sup>161</sup>.

## 1.2 Utilidad clínica del índice de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria

La determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria se utiliza como un ensayo robusto en diversas patologías hematológicas y enfermedades infecciosas<sup>114,162</sup>, convirtiéndolo en el método de evaluación más utilizado en la práctica clínica habitual como parte de las pruebas necesarias en casos de trastornos hematológicos tanto en el soporte al diagnóstico como en el seguimiento de éstas<sup>114</sup>.

Entre los trastornos hematológicos, la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria se encuentra disminuida en la leucemia mieloide crónica, síndromes mielodisplásicos y en la hemoglobinuria paroxística nocturna. Y, elevada en la policitemia vera, enfermedad de Hodgkin en su fase activa, leucemia aguda linfoblástica, y en la anemia aplásica<sup>163,164</sup>.

La actividad de la enzima también se ve alterada en pacientes con enfermedades infecciosas, siendo de utilidad para orientar si una infección es de origen vírico o bacteriano, encontrándose sus niveles disminuidos en el primer caso<sup>162</sup>, supuestamente

por el aumento del interferón segregado por los linfocitos T y aumentados en el segundo caso<sup>165</sup>.

A pesar de la asociación del nivel de actividad de la fosfatasa alcalina y determinadas enfermedades, el nivel de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria no determina un diagnóstico directo por sí solo. Sin embargo, el nivel de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria, junto con otras características clínicas del paciente, resulta de utilidad para orientar el diagnóstico, así como otras posibles pruebas clínicas a realizar. Por ejemplo, el nivel de actividad de la enzima es de utilidad para la realización del diagnóstico diferencial entre la leucemia mieloide crónica y las reacciones leucemoides neutrofilicas, pues estas últimas presentan niveles muy elevados de la enzima. No obstante, los pacientes afectos de leucemia mieloide crónica, enfermedad a la que se le asocian niveles de actividad fosfatasa alcalina muy bajos o nulos, si sufren una aplasia o una infección, presentarán un aumento de la actividad de la enzima<sup>114</sup>.

También es de interés clínico en la evolución de dicha enfermedad, pues la normalización de los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria durante la remisión terapéutica indica un pronóstico favorable, mientras que el incremento progresivo se asocia como precedente al brote blástico terminal<sup>114</sup>.

También se deben tener en cuenta las circunstancias extrahematológicas de los pacientes, como pueden ser el estrés quirúrgico, el embarazo y tratamientos con progestágenos, corticoides y/o factores de crecimiento granulomonocíticos, pues pueden causar el aumento de la actividad de la enzima<sup>114</sup>.

La utilidad de esta prueba no se limita a las patologías ya mencionadas, sino que engloba un conjunto mayor como se puede observar en la **Figura 33**, donde se muestra una clasificación de patologías asociadas a unos niveles elevados o disminuidos de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria según unos intervalos de valores normales que son establecidos en cada centro<sup>114</sup>.

Es remarcable mencionar que, a pesar de la complejidad de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria en el diagnóstico, casi siete décadas avalan su utilidad e importancia en el diagnóstico de diferentes patologías hematológicas<sup>166</sup>.

| Valores aumentados                   | Valores normales | Valores disminuidos                              |
|--------------------------------------|------------------|--|
| Anemias aplásicas                    | ←————→           | Leucemia mieloide crónica típica en fase crónica |
| Neutropenia congénita (50%)          |                  | Hemoglobinuria paroxística nocturna              |
| Policitemia Vera                     |                  | Mononucleosis infecciosa                         |
| Osteomielorreticulosis (75%)         |                  | Leucemias agudas mieloblásticas                  |
| Leucemia aguda linfoide              |                  | Síndromes mielodisplásicos                       |
| Leucemia neutrofilica crónica        |                  | Púrpura trombocitopenia idiopática               |
| Reacciones leucemoides neutrofilicas |                  | Osteomielorreticulosis (25%)                     |
| Enfermedad de Hodgkin en fase activa |                  | Sarcoidosis                                      |
| Tricoleucemia                        |                  | Colagenosis                                      |
| Benzolismo subclínico                |                  |  |

**Figura 33.** Lista de las principales hemopatías en las que se aplica la prueba de la fosfatasa alcalina granulocitaria, clasificadas según sus niveles de actividad fosfatasa alcalina granulocitaria, siguiendo el método citoquímico. Los valores normales los establece cada centro utilizando muestras control para establecer un rango de valores normales de la actividad de la enzima. (Imagen adaptada de “La citología óptica en el diagnóstico hematológico”<sup>114</sup>).

### 1.3 Método citoquímico semicuantitativo de la actividad Fosfatasa Alcalina Granulocitaria

La determinación del nivel de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria se realiza principalmente mediante una prueba citoquímica. El método citoquímico en el que está basada la prueba utilizada en la actualidad fue introducido por Menten, Junge y Green en 1944<sup>167</sup> para la localización de la fosfatasa alcalina en tejido renal. La aplicación de este método para la detección de la fosfatasa alcalina en leucocitos fue reportada por Vercauteren en 1954<sup>168</sup>, a pesar de ello, no indicó la técnica ni proceso utilizado, el cual fue descrito en detalle al año siguiente por Kaplow<sup>166</sup>, y posteriormente se describieron modificaciones referidas principalmente a los reactivos utilizados y la clasificación de la actividad de la enzima<sup>169,170</sup>.

El principio de este método citoquímico se basa en la capacidad catalítica de esta enzima para hidrolizar ésteres de fosfato a partir de fosfatos de naftol en condiciones de pH alcalino. Seguidamente, el naftol liberado se une a una sal de diazonio formando un precipitado de color pardo, visible mediante microscopia óptica, el cual precipita en el citoplasma acorde a la actividad y localización de la enzima. La intensidad de la coloración se correlaciona positivamente con la actividad de la enzima, aunque el color del precipitado puede variar según la sal diazoica utilizada<sup>167</sup>.

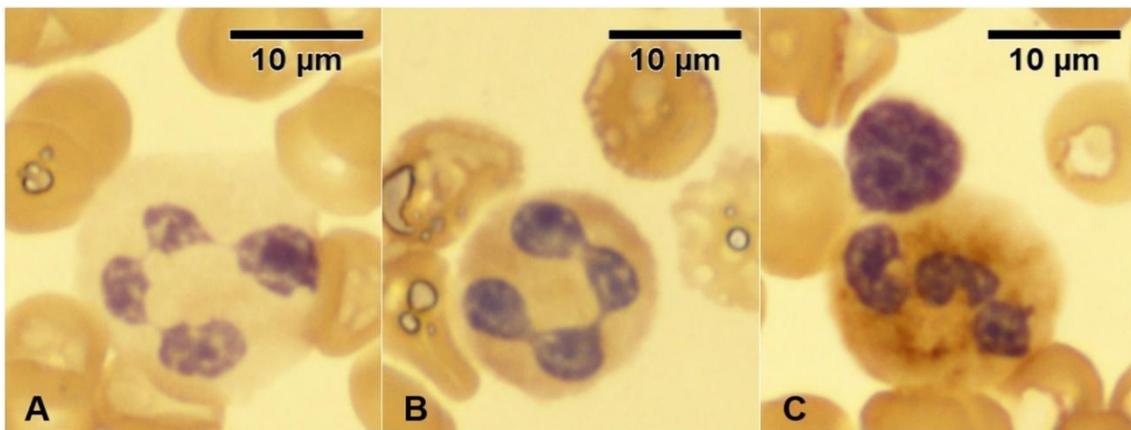
La técnica se realiza sobre extensiones de sangre periférica, para que posteriormente el personal técnico/especialista cualificado, mediante un microscopio óptico, clasifique 100 neutrófilos en diferentes categorías de actividad según el incremento de la coloración obtenida en el citoplasma de cada neutrófilo (Grado 0, Grado 1 y Grado 2) (Figura 34).

La fórmula utilizada para obtener el valor de la actividad fosfatasa alcalina de cada muestra está basada en la fórmula descrita previamente por Kaplow<sup>166</sup>, la cual es adaptable según los niveles de clasificación que aplique cada centro:

**Puntuación de la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria =**

**(Granulocitos nivel 0 × 0) + (Granulocitos nivel 1 × 1) + (Granulocitos nivel 2 × 2)**

En la **Figura 34** se muestra un ejemplo de la clasificación visual de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria en tres niveles, dependiente del observador. También existen clasificaciones de cuatro niveles<sup>171</sup> como mostró la Sociedad Americana de Hematología<sup>172</sup> (**Figura 35**) o incluso de seis como se indica en el kit Leucognost® ALPA de Merck<sup>173</sup>.



**Figura 34.** Fotografías de microscopía óptica representativas de la clasificación de la actividad de fosfatasa alcalina granulocitaria por el método citoquímico realizado con sal de diazonio azul y solución de Mayer. Muestra de categorías de intensidad de color del precipitado ocre en neutrófilos por microscopía óptica: nivel 0 (A); nivel 1 (B) y nivel 2 (C).

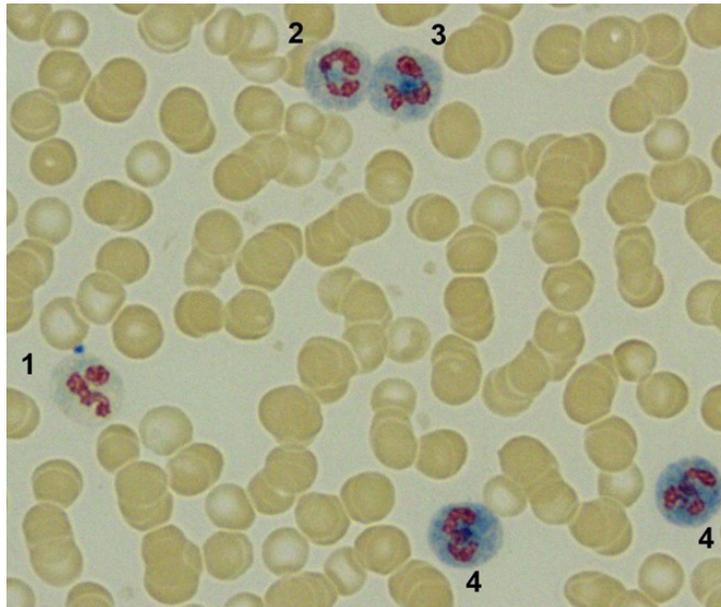


Figura 35. Fotografía de microscopía óptica clasificando los neutrófilos en hasta 4 niveles, del nivel más bajo 1 hasta el 4. Utilizando naftilo AS-B1 fosfato, hidrolizado a aril maftilamida por la fosfatasa alcalina y unido/acoplado a la sal de diazonio produciendo un precipitado azul. (Imagen adaptada del *Leukocyte alkaline phosphatase (LAP) scoring*<sup>172</sup>).

#### 1.4 Aspectos críticos de la metodología citoquímica

A pesar de ser una prueba ampliamente utilizada y, realizada satisfactoriamente en los diferentes centros, presenta algunos aspectos que con los avances actuales pueden ser mejorados.

El más importante de estos aspectos es que la prueba requiere de una evaluación subjetiva y dependiente del observador, de la intensidad colorimétrica del precipitado citoplasmático. La realización de estas evaluaciones y clasificaciones en diferentes grupos de actividad según la intensidad del color requiere en primer lugar, de personal experimentado y, en segundo lugar, el establecimiento de un rango de valores normales con los que comparar los valores de la actividad fosfatasa alcalina de los pacientes, siendo importante remarcar que el rango de valores normales es establecido por cada centro, hecho que dificulta su estandarización.

## **1.5 Papel de la citometría de flujo en la cuantificación de la fosfatasa alcalina granulocitaria**

En las últimas tres décadas se han realizado diversos intentos de adaptar la prueba de la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina a la citometría de flujo. La aplicación de la citometría de flujo supondría un apoyo al método establecido en diversos aspectos, como serían el desarrollo de un método rápido, cuantitativo y objetivo, ofreciendo también la ventaja de incrementar el poder analítico y estadístico al analizar una gran cantidad de células, en la actualidad decenas o cientos de miles por cada prueba. Asimismo, el uso de fotomultiplicadores para la detección de la fluorescencia permite obtener unas escalas de intensidad, representativas de la actividad de la enzima, muy superiores a la clasificación obtenida con microscopía óptica.

Las adaptaciones previas de la prueba citoquímica a la citometría de flujo se basaron en la utilización de paneles de anticuerpos para detectar la expresión de la proteína/enzima<sup>174,175</sup>, o en el desarrollo de un método en el que se sustituye la sal de diazonio utilizada en la reacción citoquímica por la sal *Fast Red Violet LB* o *Fast Red TR*, las cuales emiten con un pico de fluorescencia en 628/630 nm cuando se excitan con un láser de argón en 514 nm<sup>176</sup>, en todos ellos implicando la muerte de las células para su análisis.

## **1.6 Análisis digital de las imágenes de microscopía óptica de neutrófilos**

Actualmente existen herramientas bioinformáticas con capacidad para analizar imágenes digitales de microscopía óptica en escala de grises, utilizadas en el diagnóstico clínico, como se demostró hace más de una década en el análisis de metafases<sup>177</sup>.

El motivo para desarrollar un método de análisis de imagen para la fosfatasa alcalina granulocitaria fue para poder cuantificar la intensidad del color relativa a la actividad del enzima y compararla con el método desarrollado por citometría de flujo funcional.

Además, otros estudios de diferentes campos han demostrado la utilidad del análisis del color mediante herramientas informáticas para la simplificación de otras técnicas como la medición del color de la piel<sup>178</sup>, la determinación de la calidad de la carne para el consumo<sup>179</sup>, la visualización de datos ómicos<sup>180</sup>, o la cuantificación colorimétrica de dispositivos analíticos basados en papel<sup>181</sup>. Para la realización de esas aproximaciones, se utilizaron modelos de color desarrollados por la CIE (*Commission International d'Éclairage*) como el CIELAB y el RGB y, el HSB y el HSL descritos por Alvy Ray Smith en 1978<sup>182</sup>.

Taylor A. y colaboradores reportaron que la combinación y conversión de diferentes colores a escala de grises puede causar la pérdida de información y que por lo tanto la percepción humana del color y la intensidad de la escala de grises no es equivalente<sup>183</sup>.

Para explicar la percepción humana del color existen dos teorías: la teoría del color tricromático y la teoría del color opuesto<sup>184,185</sup>.

La teoría tricromática del color explica la percepción del color como la interacción de las señales recibidas por tres tipos diferentes de fotorreceptores, cada uno con una sensibilidad a un espectro de luz distinto, reconociendo los colores azul, verde y rojo.

Por otro lado, la teoría de los colores opuestos, postula que ciertos pares de colores son antagonistas unos de otros, véase rojo y verde, azul y amarillo y blanco y negro. De tal modo que, si una longitud de onda correspondiente al espectro de luz amarilla estimula su respectivo fotorreceptor, esta a su vez causa la inhibición de la visión del color azul.

Cabe mencionar que ambas teorías se han demostrado empíricamente, por lo que tal y como exponen Ohta O. y Robertson A.<sup>185</sup>, la respuesta tricromática se encuentra presente en los conos/fotorreceptores, mientras que las señales eléctricas generadas, son sometidas a un procesamiento que obedece a la teoría de los colores opuestos.

Aunque es cierto que el modelo de color CIELAB desarrollado en 1976<sup>186</sup>, basado en la teoría de los colores opuestos, es el modelo más utilizado, el modelo HSB es más adecuado para este estudio, debido a los parámetros que procesa.

Estos parámetros son: tonalidad, saturación del color e intensidad del brillo. La tonalidad hace referencia a la gradación de colores dentro del espectro de luz visible, que es el

espectro que se evalúa en este análisis. La saturación hace referencia a la intensidad de los colores, en este caso a la intensidad del precipitado que se quiere evaluar. Y el brillo es un atributo de la percepción visual de la luz emitida por una fuente de luz, en este caso la bombilla del microscopio.

Este último punto tiene especial relevancia, pues para poder comparar diferentes muestras es necesario normalizar los valores según el ruido de fondo, determinado por la intensidad de la luz. Por motivos inherentes al método, a pesar de procurar utilizar la misma intensidad de luz para la obtención de las imágenes, es posible que existan pequeñas variaciones de esta. Asimismo, si se desarrollara un método automatizado de análisis de imagen, sería necesario optimizar el sistema de iluminación para obtener unos resultados más precisos<sup>187</sup>.

## Resultados Estudio II



## 2.1 Comparación de la citometría de flujo y el método citoquímico sobre la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria

Se compararon los valores del índice de la actividad fosfatasa alcalina obtenidos mediante el método citoquímico en 29 muestras y los obtenidos mediante la aproximación por citometría de flujo. Esta comparación mostró que los valores son diferentes en término de rango de actividad de la enzima. Asimismo, demostró que los valores obtenidos por citometría de flujo producen una mayor variabilidad de la asignación de la intensidad de fluorescencia, sugiriendo que la citometría de flujo tiene una mayor sensibilidad que el método citoquímico y permite la detección de valores más elevados, que no podrían ser detectados en una clasificación de intensidad del color (Figura 36).

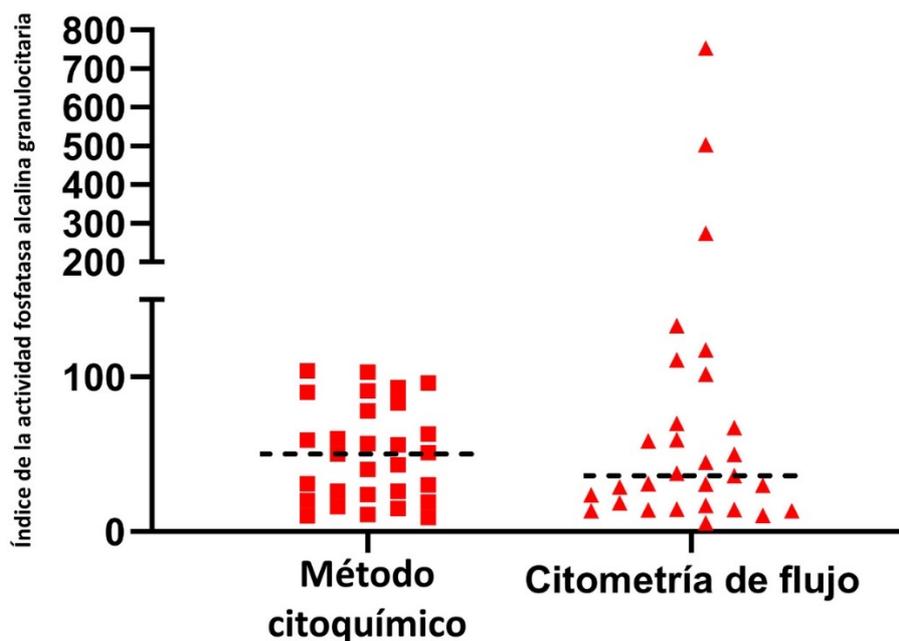
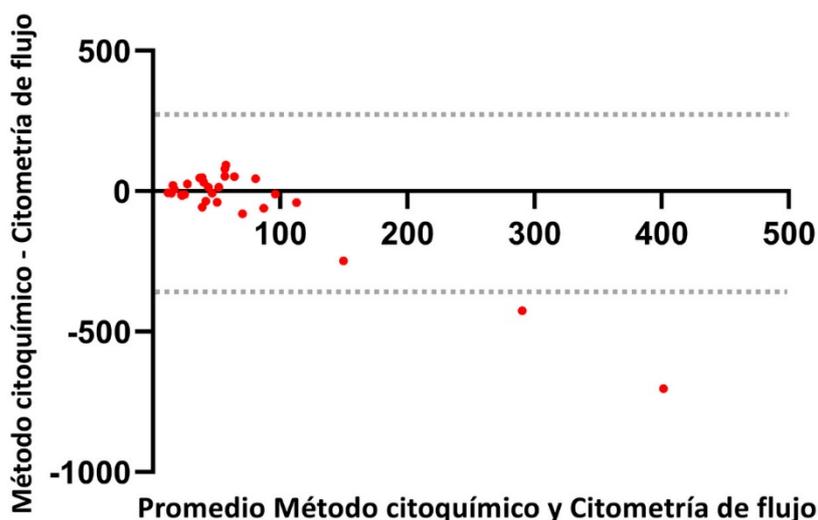


Figura 36. Comparación de los valores de la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria con el método citoquímico y por citometría de flujo. Las puntuaciones de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria se obtuvieron de n=29 muestras para ambos métodos; las puntuaciones obtenidas por el método citoquímico y las obtenidas por citometría de flujo. Las líneas horizontales de puntos representan la mediana de los valores para cada método. (Imagen adaptada de *Flow cytometric quantification of granulocytic alkaline phosphatase activity in unlysed whole blood*<sup>127</sup>).

Los valores de ambos índices, normalizados a 100, demostraron que las diferencias entre ambos métodos son estadísticamente significativas (95% IC = 17,38 – 45,95; P-valor <0,0001).

Al comparar estos mismos valores según el análisis Bland-Altman, se observó que ambos índices demostraban concordancia (sesgo = -42,3; 95% IC= 274,8 – -359,5) (**Figura 37**).



**Figura 37.** Gráfico Bland-Altman para la comparación de los valores de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria. Comparación Bland-Altman del método citoquímico y el método de citometría de flujo. (sesgo = -42,3; 95% IC= 274,8 – -359,5).

## 2.2 Comparación del análisis digital y con el sistema de clasificación dependiente del observador

Debido a las diferencias al comparar un método semicuantitativo, en este caso en el método citoquímico, con un método cuantitativo, la detección de un sustrato fluorescente mediante citometría de flujo, se realizó una aproximación con el programa de análisis de imagen ImageJ para poder cuantificar la intensidad del color, correspondiente a la intensidad de píxel.

Se cuantificó la intensidad de píxel del citoplasma de 91 imágenes de neutrófilos de una extensión de sangre preparada siguiendo el método citoquímico. Las medianas de la intensidad de píxeles mostraron diferencias significativas según la intensidad del color

(Figura 38), correspondiéndose con el valor de actividad del enzima obtenido por microscopía óptica (Kruskal-Wallis = 57,86; P-valor < 0,0001) del nivel de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria.

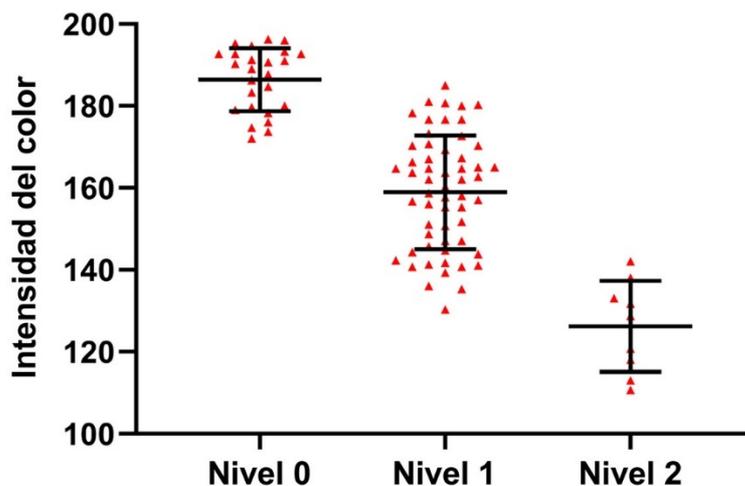


Figura 38. Clasificación de la intensidad del citoplasma de neutrófilos medida con el análisis de imagen en 32-bits. El eje X representa la clasificación del nivel de actividad fosfatasa alcalina dependiente del observador según el método citoquímico, y el eje Y representa el valor de la mediana de la intensidad de color obtenida con el programa de análisis de imagen.

### 2.3 Efecto del uso de diferentes aumentos ópticos en el análisis digital de las imágenes

Partiendo de que las imágenes obtenidas con un mayor número de aumentos muestran una menor distorsión y facilita el análisis de imagen, se comprobó si el uso de objetivos de diferentes aumentos resultaba un factor crítico para el análisis de la imagen y la obtención de las mediciones. Se compararon las imágenes tomadas con ocular de 10 aumentos y objetivos de 50 (500X) y 100 (1000X) aumentos de las mismas n=41 células.

Al comparar los valores obtenidos de la mediana y la desviación estándar según el análisis Bland-Altman, se observó que los valores obtenidos con ambos objetivos mostraban acuerdo (Figura 39). Indicando que se obtendrían resultados similares con ambos objetivos, por lo que, por ejemplo, sería un análisis más accesible al no requerir un solo objetivo específico y también podría evitarse el uso de aceite de inmersión utilizando el objetivo de 50 aumentos.

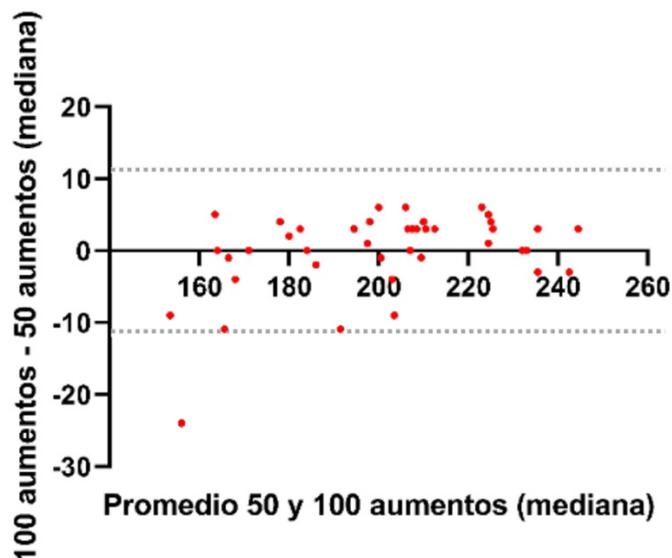


Figura 39. Gráficos Bland-Altman para la comparación de los análisis de imagen de la fosfatasa alcalina granulocitaria con el programa ImageJ. Comparación Bland-Altman de los valores de la mediana de fotografías obtenidas con objetivos de microscopía óptica de 500 y 1000 aumentos.

## 2.4 Ruido de fondo del análisis de imagen

Para poder normalizar y comparar los valores del análisis de imagen obtenido por muestra y entre las diferentes muestras es necesario cuantificar el ruido de fondo de las imágenes. En este análisis, el ruido de fondo se corresponde con la intensidad de la iluminación y el espacio extracelular, es por ello por lo que se utiliza este último para cuantificar el ruido de fondo.

Se determinó si sería más adecuado obtener el valor de ruido de fondo midiendo una sección del espacio extracelular colindante a la célula a analizar (ruido de fondo parcial, RFP), o todo el espacio extracelular de la imagen digitalizada (ruido de fondo completo, RFC), siendo más precisa la primera opción, pero sujeta a la subjetividad al seleccionar la región específica, mientras que la segunda opción eliminaría dicha subjetividad. Se compararon los valores obtenidos de las secciones extracelulares adyacentes a los neutrófilos analizados con los valores de espacio extracelular completo de 69 fotografías obtenidas de la misma extensión de una muestra.

Las regresiones lineales para estudiar la relación entre los valores de ruido de fondo obtenidos con ambas aproximaciones confirmaron la similitud de ambas aproximaciones ( $R^2=0,8073$ ;  $y=1,0098x$ ;  $n=69$ ) (Figura 40).

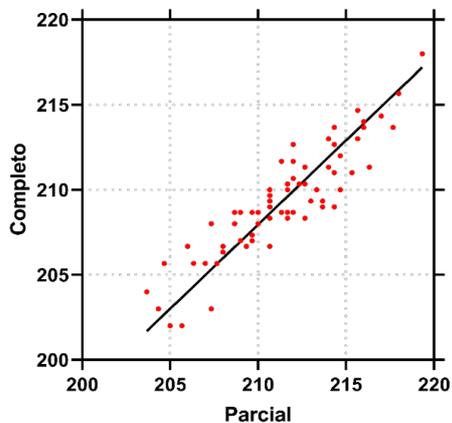


Figura 40. Cuantificación del ruido de fondo de las fotografías de extensiones de neutrófilos para normalizar los valores de fotografías de diferentes muestras. Comparación de los valores obtenidos al cuantificar la intensidad de la iluminación y espacio extracelular de toda la fotografía (ruido de fondo completo) (eje Y) con los valores obtenidos al cuantificar una región colindante a la célula de interés (ruido de fondo parcial) (eje X) con el modelo de color HSB en el programa ImageJ. El gráfico de regresión lineal muestra una buena correlación entre ambas aproximaciones de cuantificación del ruido de fondo ( $R^2=0,8073$ ;  $y=1,0098x$ ;  $n=69$ ).

Según el análisis Bland-Altman, se observó que los valores de ambos ruidos de fondo mostraban concordancia, mostrando que ambas medidas del ruido de fondo son válidas. (Figura 41).

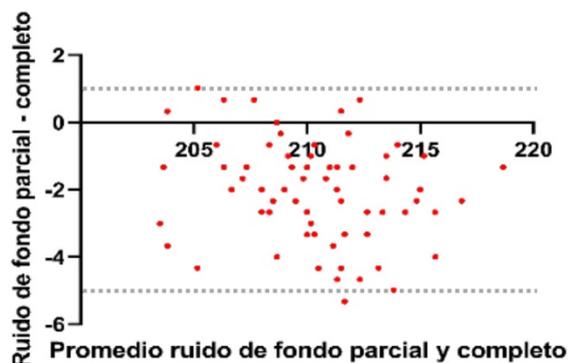


Figura 41. Gráfico Bland-Altman para la comparación de la cuantificación del ruido de fondo de las fotografías. Comparación Bland-Altman de los valores de ruido de fondo de una sección extracelular colindante a la célula de interés y de todo el espacio extracelular.

## **2.5 Correlación del análisis de color HSB con la clasificación dependiente de observador**

Se demostró la capacidad del análisis de imagen en 32-bits para cuantificar la intensidad del color del precipitado citoplasmático en neutrófilos, de forma comparable a la clasificación visual en una misma muestra. La comparativa de diferentes muestras presentó limitaciones debido a la superposición de la intensidad del color del núcleo y de los precipitados citoplasmáticos en neutrófilos con una elevada actividad fosfatasa alcalina granulocitaria. Por ello se realizó el análisis con el modelo de color HSB sobre un total de 199 fotografías obtenidas de tres extensiones diferentes; Muestra 1 (n=83), Muestra 2 (n=54) y Muestra 3 (n=62).

Las medianas de la intensidad de pixeles mostraron diferencias significativas según la intensidad del color, correspondiéndose con la clasificación clínica del nivel de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria para cada una de las tres muestras individualmente (Muestra 1 Kruskal-Wallis=59,78; P-valor < 0,0001; Muestra 2 Kruskal-Wallis=22,22; P-valor < 0,0001; Muestra 3 Kruskal-Wallis=37,73; P-valor < 0,0001) y en conjunto (Kruskal-Wallis=112,8; P-valor < 0,0001) (**Figura 42**).

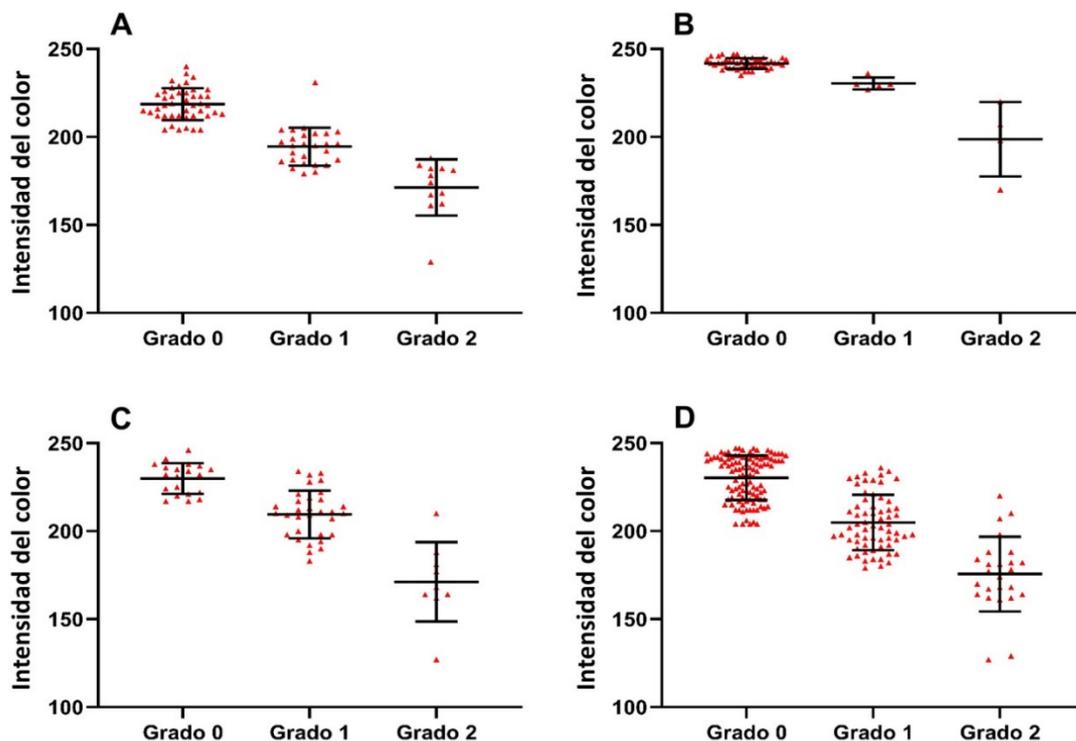


Figura 42. Intensidad de precipitados en el citoplasma de neutrófilos medida con el análisis de imagen según el modelo de color HSB. El eje X representa la clasificación del nivel de fosfatasa alcalina dependiente del observador según el método citoquímico y el eje Y representa el valor de la mediana de la intensidad de color obtenida con el programa de análisis de imagen. A. Muestra 1, n=83; B. Muestra 2, n=54; C. Muestra 3, n=62; D. Muestras 1 a 3, n=199.

## 2.6 Comparación de los métodos citoquímico, de citometría de flujo y de análisis digital para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria

Para comparar los valores obtenidos, se prepararon tres muestras adicionales de sangre periférica con los siguientes métodos: 1) el método citoquímico utilizando el análisis visual de las extensiones; 2) el método citoquímico utilizando el análisis de imagen digital HSB sobre las fotografías de microscopía óptica de las mismas extensiones; 3) el método de análisis digital HSB y 4) el método de citometría de flujo (**Figura 43**). Al comparar los resultados obtenidos con el método citoquímico y el análisis de las fotografías utilizando la fórmula del método citoquímico, se observaron diferencias que

oscilan entre un 29% y 35%. Según los resultados previos de la correlación entre la clasificación dependiente del observador y el valor de intensidad obtenido por el análisis digital (**Figura 42**), estas diferencias son posiblemente debidas principalmente a que se analizan de diferentes células presentes en la extensión.

Sin embargo, al comparar los valores obtenidos de las mismas fotografías con el análisis digital utilizando la fórmula del método citoquímico y con la fórmula desarrollada como aproximación a esta, indicado como HSB, aunque se observa una tendencia similar entre las 3 muestras analizadas, mostraron unas diferencias que oscilan entre un 23% y 56%, las cuales son posiblemente debidas a la comparación entre un método semicuantitativo y uno cuantitativo.

Al comparar los dos métodos cuantitativos (HSB y citometría de flujo) se observan diferencias que oscilan entre un 21% y 79% y tendencias diferentes entre las 3 muestras analizadas. Además, al comparar el método de citometría de flujo con el resto de los métodos estudiados, las diferencias oscilan entre un 12% y 84%. Estas diferencias posiblemente sean debidas a la mayor sensibilidad de la citometría de flujo y eventos analizados respecto los métodos comparados, al método de mínima manipulación de la muestra y a la posible detección de diferentes actividades fosfatasa alcalina.

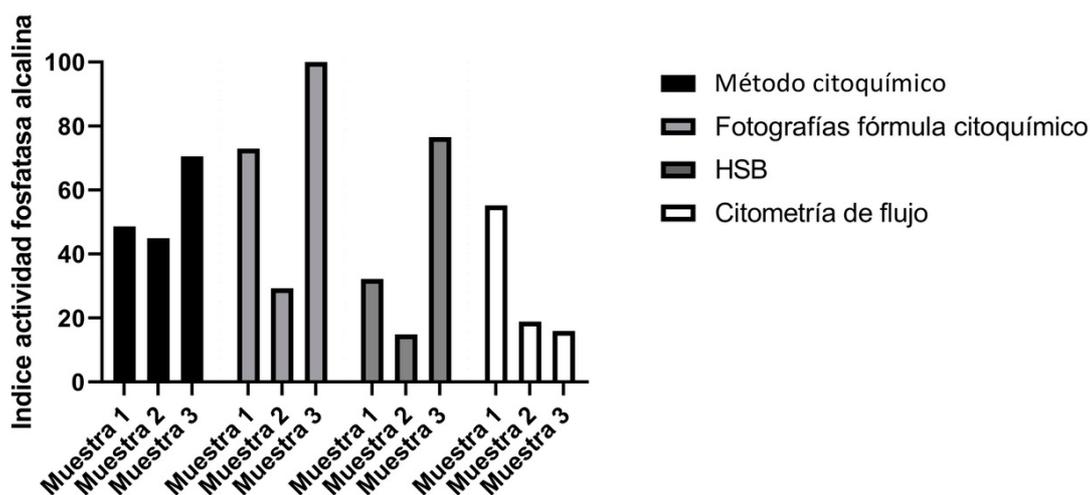


Figura 43. Índices de actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria obtenidos de tres muestras y 2 análisis semicuantitativos y 2 cuantitativos. Los resultados están normalizados respecto al valor más elevado.

**Estudio III: Cuantificación de progenitores  
hematopoyéticos CD34+ mediante sistemas  
volumétricos**



## Introducción Estudio III



## 1.1 El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

El trasplante de progenitores hematopoyéticos es uno de los procedimientos realizados en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas, considerado potencialmente curativo<sup>188</sup>. La finalidad del trasplante de progenitores hematopoyéticos es el restablecimiento del sistema hematopoyético e inmunitario del paciente mediante una infusión intravenosa de estos. Para ello se realiza previamente un tratamiento de acondicionamiento al paciente para eliminar tanto las células neoplásicas o patológicas, como los componentes celulares del sistema hematopoyético de este. Estos progenitores hematopoyéticos utilizados en el trasplante pueden proceder del mismo paciente (trasplante autólogo) o de un donante compatible (trasplante alogénico)<sup>189</sup>. En este caso, de donantes HLA-idénticos que pueden ser o no emparentados, donantes HLA-no idénticos o, sangre de cordón umbilical<sup>190</sup>.

En los inicios de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos, se realizaba el trasplante de la médula ósea del donante, concretamente de las crestas ilíacas posteriores. Los seis primeros trasplantes fueron llevados a cabo por el equipo del profesor Donnall E. Thomas en 1957<sup>191</sup> y aunque algunas de las muestras no procedían de las crestas ilíacas de los donantes, sino también de costillas o huesos largos, sentó las bases para los trasplantes de médula ósea tal y como se conocen hoy en día. En la actualidad, la obtención de estos progenitores proviene en la mayoría de los casos de la sangre periférica movilizada del donante. Las muestras de sangre periférica movilizada se obtienen mediante el proceso de leucoaféresis<sup>192</sup>, tras someter al donante a un proceso de movilización. Este proceso consiste en la administración de factores estimulantes como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), provocando la proliferación de neutrófilos y la liberación de proteasas que degradan las proteínas que mantienen las células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea. Conjuntamente, si es necesario, se administran agentes movilizadores como el plerixaflor, un fármaco antagonista del receptor alfa de la citoquina CXCR4 presente en las células progenitoras CD34+ de la médula ósea, impidiendo su unión al

SDF-1 y causando la movilización de estas células de la médula ósea a la sangre periférica.

La necesidad de este proceso de movilización se debe a que los progenitores hematopoyéticos representan una proporción minoritaria de las células circulantes en la sangre periférica normal. Estos son identificados con el marcador CD34, el cual fue identificado en las células progenitoras hematopoyéticas y células madre en 1984 por Civin Cl. y colaboradores<sup>193</sup>.

Este proceso requiere de un cuidadoso y preciso recuento de las células progenitoras hematopoyéticas CD34+. Esto es debido a que para asegurar que el injerto tenga éxito y reducir la morbilidad del paciente y el tiempo que requerirá su recuperación hematológica, se requiere de una cantidad mínima de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ para infundir en el paciente. Según algunos autores, se requieren de 2 a 5 millones de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ por kilogramo del paciente en los trasplantes autólogos<sup>194-197</sup> y entre 4 y 7 en los alogénicos<sup>198,199</sup>, aunque se recomienda un trasplante de al menos 8 millones de progenitores en los trasplantes autólogos<sup>194,195</sup>. Según las recomendaciones de la ISHAGE, normalmente es suficiente con la reinfusión de 2 millones de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ por kilogramo de peso<sup>42</sup>. Para obtener esta cantidad de células progenitoras hematopoyéticas CD34+, es necesario saber en qué momento iniciar el proceso de leucoaféresis, por ello es necesario realizar la monitorización del recuento de las células CD34+ por citometría de flujo, pues las concentraciones obtenidas en la recolección por leucoaféresis se correlacionan con el recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ en sangre periférica<sup>200-204</sup>. Una concentración de  $10-20 \times 10^3$  células CD34+/mL en sangre periférica movilizada<sup>205</sup>, la cual se alcanza aproximadamente en el quinto y noveno día en el caso de trasplantes alogénicos y autólogos respectivamente, tras el inicio del tratamiento de movilización, es considerada un buen valor de corte para proceder a la leucoaféresis<sup>206,207</sup>.

## 1.2 Sistemas de recuento de células CD34+

Tras el descubrimiento del marcador CD34 en las células madre hematopoyéticas, se realizaron diversos estudios para su cuantificación. Entre estos estudios destacan el Protocolo de Milán<sup>208</sup>, el estudio de Bender y colaboradores que incluyó el uso del anticuerpo CD45<sup>209</sup> y las recomendaciones de la ISHAGE<sup>210</sup>. Estas últimas establecieron las bases del método más extensamente utilizado para la cuantificación de las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ en la sangre, caracterizadas por la ya mencionada expresión del marcador CD34 y la expresión débil del marcador CD45. El método presentado requería de un contador hematológico para realizar el conteo absoluto de leucocitos y determinar el número de células CD34+ presentes en la muestra, minimizando de esta manera la variación obtenida con los conteos manuales. Así pues, a este método también se conoce como *Dual-Platform*. Otra de las características relevantes del método ISHAGE, fue el uso de 4 parámetros (FSC, SSC, CD45 FITC y CD34 PE) para identificar las células progenitoras hematopoyéticas CD34+, creando de esta manera un método aplicable en la mayor cantidad posible de laboratorios.

En 1998 se publicó una revisión de estas recomendaciones<sup>42</sup>, en la que se incluyó el uso del marcador de viabilidad celular 7-Amino Actinomicina D (7-AAD), la aplicación del método de lisis sin lavado para minimizar la pérdida celular y el uso de microesferas de una concentración conocida en lugar de un contador hematológico, permitiendo realizar la cuantificación en una única plataforma (*Single-Platform*)<sup>211</sup>. En la misma publicación se mostró la comparación de los métodos de plataforma dual y plataforma única con 72 muestras, demostrando un elevado grado de concordancia y sin un sesgo significativo.

El hecho de que el sistema de plataforma única aporte unos resultados similares al sistema de plataforma dual y la mejora en la facilidad de la realización de la técnica, justificó el cambio al sistema de plataforma única a pesar de los costes económicos, según Naithani R. y colaboradores<sup>212</sup>. Además, según Barnett y colaboradores, el sistema de plataforma única mejoraría la estandarización en ensayos multicéntricos<sup>211</sup>.

Cabe remarcar que las recomendaciones de la ISHAGE, las más utilizadas según UK-NEQAS<sup>213</sup>, tienen en cuenta todo el proceso necesario para la cuantificación de los progenitores, la obtención de la muestra, el transporte y evaluación de la integridad de

esta, el marcaje de las células para su análisis, su adquisición por citometría de flujo y su posterior análisis. Y también cumplen con los criterios para un ensayo clínico de rutina de recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup><sup>41</sup>:

1. Simplicidad, para permitir una extensa aplicabilidad.
2. Sensibilidad, debido a que las células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> se clasifican como población minoritaria.
3. Precisión, para proporcionar resultados clínicamente relevantes.
4. Reproducibilidad, para proporcionar resultados clínicamente fiables.
5. Velocidad, para poder proporcionar los resultados en el menor tiempo posible.

### **1.3 El fenómeno de la desaparición de las microesferas**

A pesar de cumplir cuidadosamente los criterios mencionados en el apartado anterior, el método de plataforma única, el más extendido y aceptado actualmente, todavía presenta margen para la implementación de mejoras, principalmente debido al fenómeno de la desaparición de las microesferas<sup>214</sup>. Este fenómeno causa una disminución en la concentración de las microesferas y reduce el número total y relativo de estas en la cuantificación, causando que los resultados muestren una concentración de células CD34<sup>+</sup> mayor de la real. Bruno Brando y colaboradores demostraron que este fenómeno se producía al mezclar las muestras en un agitador debido a la carga electrostática que producía el roce del tubo de poliestireno con la goma del agitador<sup>214</sup>. A su vez, descartaron otras posibles causas como la formación de burbujas en la muestra, la fragmentación de las microesferas y la sedimentación de estas<sup>214</sup>. También demostraron que la adición de proteínas plasmáticas a la muestra podía atenuar este fenómeno, hecho que fue corroborado por otros autores<sup>51,215,216</sup>.

Cabe mencionar la importancia de este fenómeno en las muestras de leucoaféresis, las cuales presentan una concentración disminuida de proteína en comparación a muestras de sangre periférica, mostrando un efecto mayor de dicho fenómeno. Esto se debe al uso de elevadas cantidades de anticoagulante de citrato, de preferencia sobre la

heparina<sup>217</sup>, y especialmente a la dilución requerida en la preparación de la muestra para minimizar la concentración celular que puede causar la agregación celular, incremento de la coincidencia y que los anticuerpos no saturen su antígeno.

También resulta destacable que en las recomendaciones de la ISHAGE de 1998<sup>42</sup> se reportó un incremento de entre el 5% y 10% en los valores obtenidos con microesferas liofilizadas, en comparación al método de plataforma dual, tres años antes de que Bruno Brando y colaboradores<sup>214</sup> describiesen el fenómeno de la desaparición de las microesferas con unos efectos similares en el recuento de células CD34+. Sin embargo, sí se tuvo en cuenta este fenómeno en el *Current Protocols in Cytometry* del 2003 de Sutherland D.R. y colaboradores<sup>218</sup>.



## Resultados Estudio III



## 2.1 Recuento de células CD34+ mediante sistema de plataforma única y sistema volumétrico real

Se comparó el recuento absoluto de células CD34+ analizadas en el citómetro de flujo Attune™ NxT, obtenido con el método volumétrico basado en microesferas y el método volumétrico real.

Las regresiones lineales para estudiar la relación entre los recuentos volumétricos real y de microesferas de células CD34+ confirmaron la precisión de cada método, comparando las concentraciones de células CD34+ inferiores a 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  según los valores obtenidos con el sistema volumétrico real ( $R^2=0,973$ ;  $y=0,759x$ ;  $n=17$ ) (**Figura 44 A**), 25 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,982$ ;  $y=0,798x$ ;  $n=30$ ) (**Figura 44 B**), 100 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,983$ ;  $y=0,806x$ ;  $n=48$ ) (**Figura 44 C**) y 250 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,992$ ;  $y=0,782x$ ;  $n=55$ ) (**Figura 44 D**). Ambos métodos mostraron una buena correlación y se obtuvieron recuentos más altos utilizando el método de microesferas.

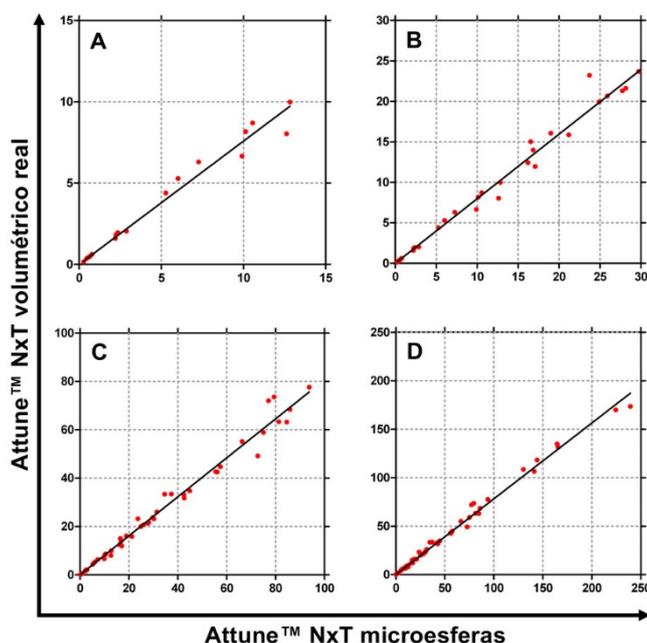
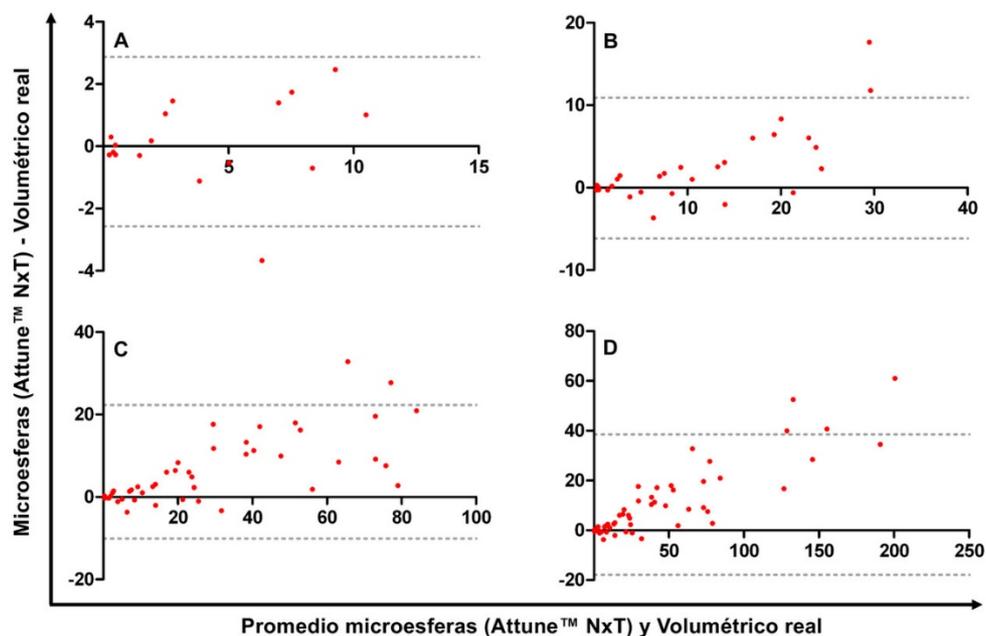


Figura 44. Cuantificación de células CD34+ con el sistema volumétrico (eje Y) y el método basado en microesferas (eje X) en el Attune™ NxT de muestras de sangre periférica y sangre periférica movilizada. Los gráficos de regresión lineal comparan los recuentos de células CD34+ obtenidos por ambos métodos, inferiores a: A. 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,973$ ;  $y=0,759x$ ;  $n=17$ ); B. 25 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,982$ ;  $y=0,798x$ ;  $n=30$ ); C. 100 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,983$ ;  $y=0,806x$ ;  $n=48$ ) y; D. 250 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0,992$ ;  $y=0,782x$ ;  $n=55$ ).

La comparación entre el sistema basado en microesferas y el sistema volumétrico real con el análisis de Bland-Altman mostró un incremento del recuento de células CD34+ obtenido con el primer sistema respecto del segundo, a medida que se incrementaba la concentración de células CD34+: recuento inferior a 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 1.18, 95% IC = -1.4 a 3.7) (**Figura 45 A**), inferior a 25 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 2.61, 95% IC = -1.9 a 7.1) (**Figura 45 B**), inferior a 100 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 6.11, 95% IC = -6 a 18.2) (**Figura 45 C**) e inferior a 250 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 10.17, 95% IC = -15.9 a 36.3) (**Figura 45 D**).



**Figura 45.** Gráficos Bland-Altman para comparar los métodos de cuantificación de células CD34+ mediante microesferas y el sistema volumétrico real en el Attune™ NxT. Recuento de células inferior a: (A) 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 1.18, 95% IC = -1.4 a 3.7). (B) 25 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 2.61, 95% IC = -1.9 a 7.1). (C) 100 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 6.11, 95% IC = -6 a 18.2). (D) 250 células CD34+/ $\mu\text{L}$  (sesgo = 10.17, 95% IC = -15.9 a 36.3).

Posteriormente se compararon los valores obtenidos utilizando el sistema volumétrico real en el Attune™ NxT con los obtenidos por el sistema de microesferas en un citómetro diferente, el Cytomics FC500™. Nuevamente las regresiones lineales confirmaron la precisión de cada método, comparando las concentraciones inferiores a 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  según los valores obtenidos con el sistema volumétrico real ( $R^2 = 0,860$ ;  $y = 0,917x$ ;  $n = 17$ ) (**Figura 46 A**), 25 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,902$ ;  $y = 0,758x$ ;  $n = 30$ ) (**Figura**

46 B), 100 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,95$ ;  $y=0,791x$ ;  $n=48$ ) (Figura 46 C) y 250 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,98$ ;  $y=0,778x$ ;  $n=55$ ) (Figura 46 D).

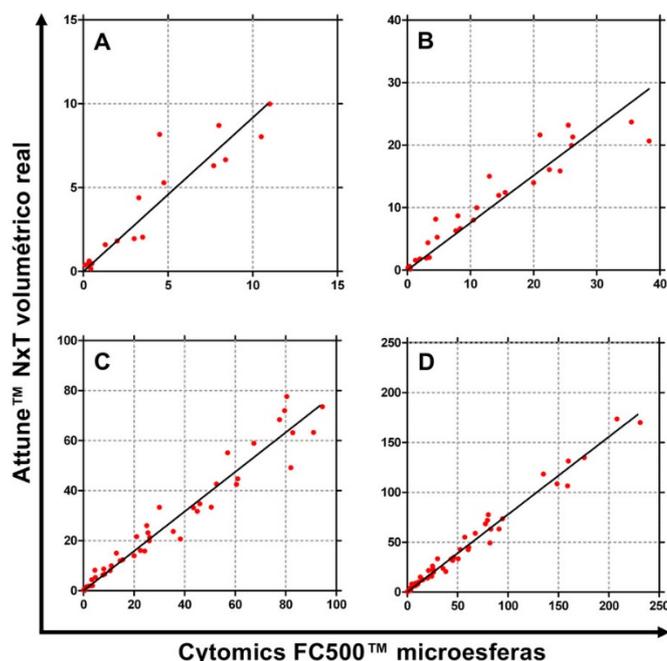


Figura 46. Cuantificación de células CD34+ por citometría de flujo utilizando el método ISHAGE de plataforma única basado en el sistema volumétrico real en el Attune™ NxT y en microesferas en el Cytomics FC500™. Comparación de los resultados del sistema volumétrico real (eje Y) en el Attune™ NxT, con el método basado en microesferas (eje X) en el Cytomics FC500™ en muestras de sangre periférica y sangre periférica movilizada. El gráfico de regresión lineal muestra una buena correlación entre ambos métodos en el recuento de células CD34+ inferior a: A. 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,860$ ;  $y=0,917x$ ;  $n=17$ ); B. 25 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,902$ ;  $y=0,758x$ ;  $n=30$ ); C. 100 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,95$ ;  $y=0,791x$ ;  $n=48$ ) y; D. 250 células CD34+/ $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0,98$ ;  $y=0,778x$ ;  $n=55$ ).

El análisis Bland-Altman del método mediante microesferas para la cuantificación de células CD34+ mostró una tendencia similar a la anterior comparación, con un mayor recuento de células CD34+ siguiendo el método con microesferas, incrementándose a mayores concentraciones de estas (Figura 47).

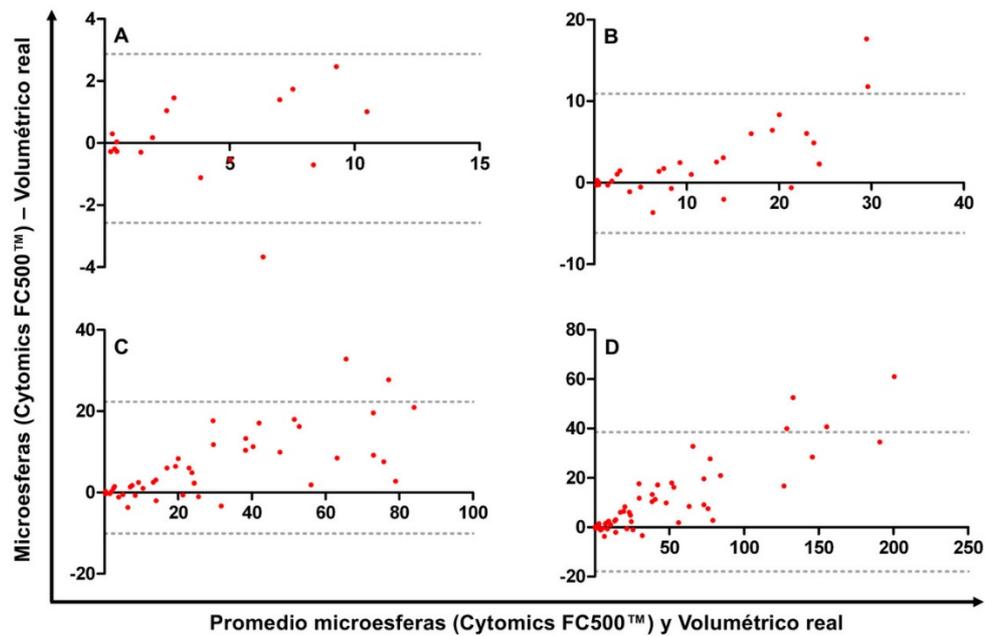


Figura 47. Gráficos Bland-Altman para comparar los métodos de cuantificación de células CD34+ mediante microesferas en el Cytomics FC500™ y el sistema volumétrico real en el Attune™ NxT. Recuento de células inferior a: (A) 10 células CD34+/μL (sesgo = 0.15, 95% IC = -2.6 a 2.9). (B) 25 células CD34+/μL (sesgo = 2.37, 95% IC = -6.2 a 10.9). (C) 100 células CD34+/μL (sesgo = 6.12, 95% IC = -10.1 a 22.3). (D) 250 células CD34+/μL (sesgo = 10.32, 95% IC = -17.8 a 38.5).

Adicionalmente, se comparó la cuantificación de células CD34+ utilizando el método de microesferas en el Attune™ NxT y el Cytomics FC500™.

Los resultados obtenidos de las regresiones lineales fueron similares a los observados previamente, mostrando correlación entre los valores obtenidos en ambos citómetros, al comparar las concentraciones de células CD34+ inferiores a 10 células CD34+/μL según los valores obtenidos en el Attune™ NxT ( $R^2=0,931$ ;  $y=1,1x$ ;  $n=13$ ), 25 células CD34+/μL ( $R^2=0,944$ ;  $y=0,978x$ ;  $n=25$ ), 100 células CD34+/μL ( $R^2=0,962$ ;  $y=0,98x$ ;  $n=48$ ) y 250 células CD34+/μL ( $R^2=0,98$ ;  $y=0,993x$ ;  $n=55$ ) (Figura 48).

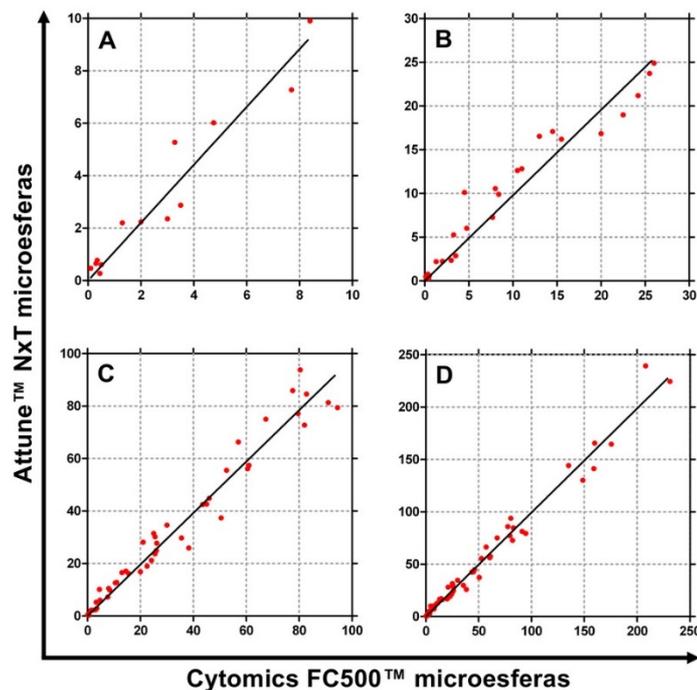


Figura 48. Cuantificación de células CD34+ por citometría de flujo utilizando el método ISHAGE de plataforma única basado en microesferas en el Attune™ NxT y en el Cytomics FC500™. Comparación de los resultados del método basado en microesferas en el Attune™ NxT (eje Y), y en el Cytomics FC500™ (eje X) en muestras de sangre periférica y sangre periférica movilizada. El gráfico de regresión lineal muestra una buena correlación entre ambos métodos en el recuento de células CD34+ inferior a: A. 10 células CD34+/μL ( $R^2=0,931$ ;  $y=1,1x$ ;  $n=13$ ); B. 25 células CD34+/μL ( $R^2=0,944$ ;  $y=0,978x$ ;  $n=25$ ); C. 100 células CD34+/μL ( $R^2=0,962$ ;  $y=0,98x$ ;  $n=48$ ) y D. 250 células CD34+/μL ( $R^2=0,98$ ;  $y=0,993x$ ;  $n=55$ ).

El análisis Bland-Altman del método mediante microesferas para la cuantificación de células CD34+, mostró concordancia entre ambos citómetros de flujo (**Figura 49**). La tendencia observada en las pruebas anteriores en las que las diferencias en el recuento de células CD34+ obtenido con el sistema de microesferas respecto el sistema volumétrico real se incrementaba a medida que incrementaba la concentración de células CD34+, no se observó al comparar los recuentos obtenidos con el sistema de microesferas en dos citómetros diferentes.

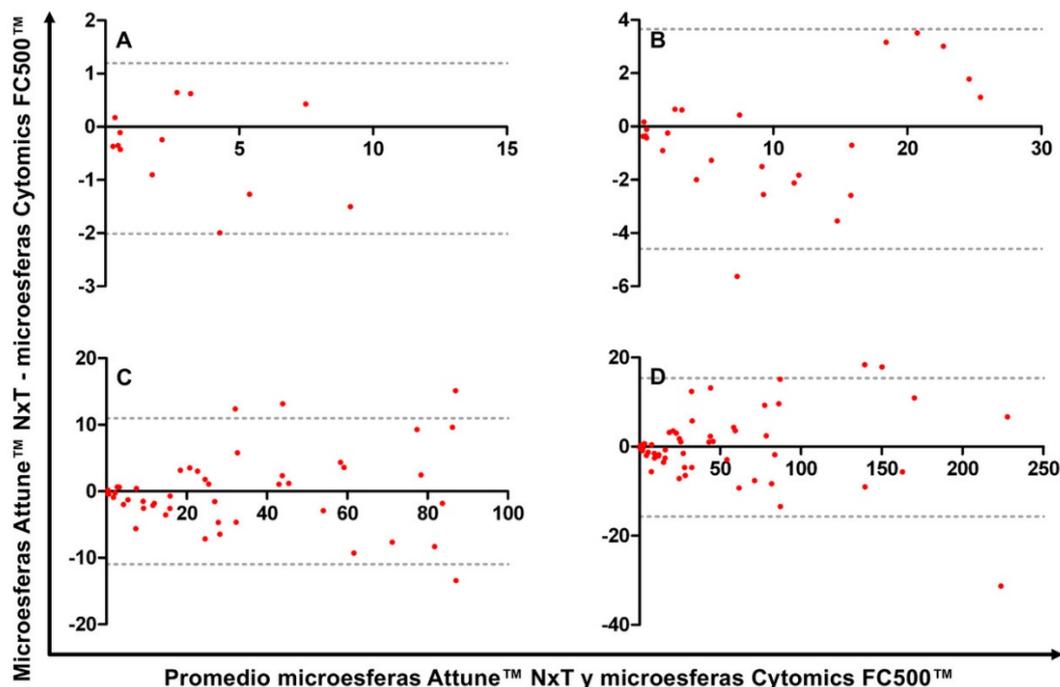


Figura 49. El análisis de concordancia entre la cuantificación de células CD34+ por el método de microesferas en el Attune™ NxT y en el Cytomics FC500™. Recuento de células inferior a (A) 10 células CD34+/μL (sesgo = -0,41, 95% IC = -2 a 1,2), (B) 25 células CD34+/μL (sesgo = -0,47, 95% IC = -4,6 a 3,7), (C) 100 células CD34+/μL (sesgo = 0,01, 95% IC = -10,9 a 11), y (D) 250 células CD34+/μL (sesgo = 0,15, 95% IC = -15,4 a 15,7).

## 2.2 Efecto del fenómeno de desaparición de las microesferas en el recuento de células CD34+

Una vez comprobada la obtención de un mayor recuento de células CD34+ según el sistema de microesferas en comparación al volumétrico real, se analizaron los valores próximos a los valores de corte para proceder a la leucoaféresis.

Para reducir las variables y evaluar únicamente las diferencias en los recuentos obtenidos con el uso de microesferas y sin estas, se analizaron los valores obtenidos de las 55 muestras adquiridas en el Attune™ NxT.

Al comparar los valores obtenidos según las microesferas y el sistema volumétrico real, se observó la tendencia del incremento del recuento a partir de las 30 células CD34+/μL aproximadamente (**Figura 50**).

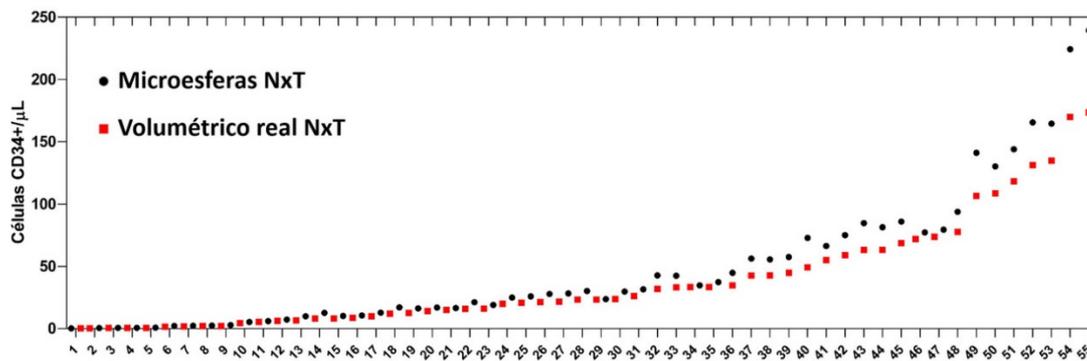


Figura 50. Recuento de células CD34+ en el Attune™ NxT. Recuentos obtenidos de 55 muestras de sangre periférica y sangre periférica movilizada, según el sistema de microesferas (en negro) y volumétrico real (en rojo).

Considerando que el punto de corte para iniciar la leucoaféresis se encuentra entre las 10 y 20 células CD34+/ $\mu$ L, aproximadamente entre el quinto y noveno día del inicio del tratamiento de movilización, se analizaron los valores inferiores a 20 células CD34+ (Figura 51). Se observó que las diferencias entre valores incrementaron visiblemente en valores inferiores a 10 células CD34+/ $\mu$ L. Estas diferencias en el rango de corte de 10 – 20 células CD34+/ $\mu$ L mostraron que cuatro muestras habían superado el umbral de 10 células CD34+ / $\mu$ L mínimas para proceder a la leucoaféresis según el recuento realizado con microesferas, mientras que con el sistema volumétrico real no habrían alcanzado dicho umbral.

Cabe destacar que las diferencias en los recuentos de células CD34+ de estas cuatro muestras al comparar los resultados obtenidos entre ambos sistemas de cuantificación, mostraron un incremento de entre un 18% y un 36% al utilizar el sistema de microesferas. Asimismo, al comparar los resultados de las 55 muestras, el incremento medio fue de un 21%.

Estos resultados indican que las muestras cuyos recuentos de células CD34+ superen las 10 células CD34+/ $\mu$ L por un margen inferior a un 21%, podrían no contener 10 células CD34+/ $\mu$ L, pudiendo repercutir negativamente en el proceso de leucoaféresis y trasplante.

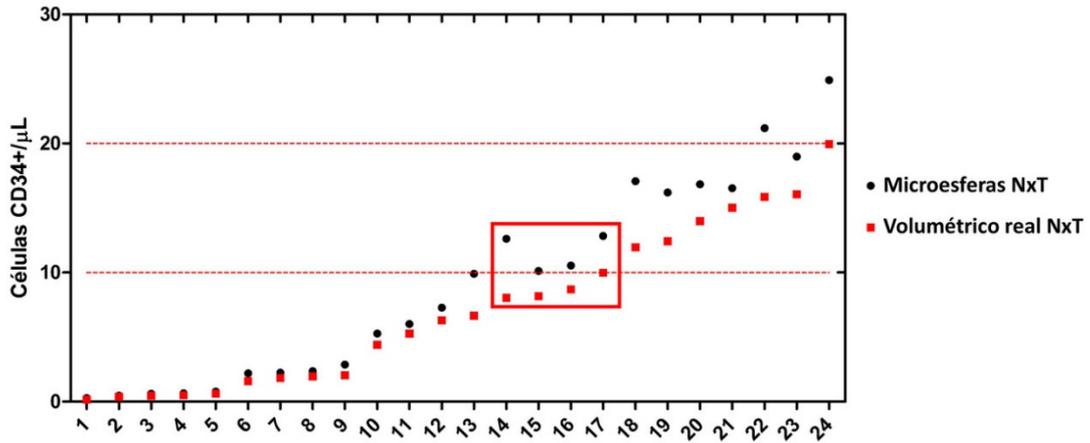


Figura 51. Recuento de células CD34+ en el Attune™ NxT según el sistema de microesferas (en negro) y volumétrico real (en rojo). Los valores incluidos son los inferiores a 20 células CD34+ según el sistema volumétrico real. Los límites del recuento de 10 y 20 células CD34+ se indican entre las líneas discontinuas en rojo. En el recuadro, 4 muestras con un recuento inferior a 10 células CD34+ según el sistema volumétrico real y superiores según el sistema de microesferas.

## **Estudio IV: Validación de anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos para el mercado CE-IVD**



## Introducción Estudio IV



## 1.1 Clasificación regulatoria de reactivos: IVD, CE, ASR, RUO

Los equipos, material fungible y, en el caso de la presente Tesis, los reactivos, más específicamente los anticuerpos utilizados en laboratorio para uso experimental y diagnóstico, están clasificados en diferentes certificados según el uso para el cual están destinados. Estos certificados regulados por la FDA son RUO (*Research Use Only*)<sup>219</sup>, ASR (*Analyte Specific Reagent*)<sup>220</sup> e IVD (*In Vitro Diagnostic*)<sup>221</sup>. Y para su comercialización dentro del Espacio Económico Europeo<sup>222</sup>, también existe el certificado CE (*Conformité Européenne*)<sup>223</sup>, regulado por el parlamento europeo, el consejo de la unión europea y los suborganismos correspondientes<sup>224</sup>.

Los **reactivos IVD** son aquellos utilizados en el diagnóstico de enfermedades u otras afecciones, con el fin de curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedades o sus consecuencias<sup>221</sup>.

Los **reactivos ASR** pueden ser anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, proteínas receptoras específicas, ligandos, secuencias de ácidos nucleicos y reactivos similares, diseñados para su aplicación en el diagnóstico, mediante la identificación y cuantificación de sus dianas<sup>220</sup>.

Los **reactivos RUO** son productos que cumplen con la norma ISO 9001 los cuales no han sido aprobados para el uso clínico. Por lo tanto, su uso está limitado a la investigación<sup>219</sup>.

Los **reactivos CE** son reactivos IVD que han sido testados con muestras clínicas y cumplen con la directiva europea 98/79/CE, superando los controles exigidos y, por lo tanto, pueden ser utilizados con fines de diagnóstico clínico en los países miembros de la Unión Europea, en el área de libre comercio europeo, Suiza y Turquía<sup>225</sup>.

## 1.2 Validación de reactivos para su utilización en el diagnóstico *in vitro*

La validación de reactivos para uso en IVD, en el caso de este estudio, anticuerpos monoclonales, es un paso necesario para ofrecer herramientas a los profesionales clínicos que permitan ayudarles y mejorar tanto los diagnósticos como el seguimiento de patologías, ya sea porque los nuevos reactivos permitan identificar mejor las

poblaciones de interés, como por el hecho de disponer de una mayor librería de anticuerpos monoclonales que permita crear paneles más complejos o simples. Para que estos productos puedan ser comercializados y utilizados con dichos fines sanitarios, es fundamental que obtengan primero la certificación IVD y, en el caso de la zona europea y países asociados, la certificación CE-IVD.

El proyecto desarrollado en esta Tesis incluye la validación de anticuerpos monoclonales destinados a apoyar el diagnóstico, clasificación y seguimiento de hemopatías, leucemias y linfomas mediante citometría de flujo. En el momento de la escritura de esta Tesis se han validado 134 anticuerpos.

Para poder ofrecer unos reactivos de calidad para el diagnóstico *in vitro*, es necesario que el proceso de validación sea exhaustivo, metódico y con conocimiento de lo que se está evaluando y su finalidad, con tal de verificar si cada reactivo es capaz de reconocer de forma reproducible y fiable, utilizando muestras clínicas, el epítipo que expresa el antígeno para el cual han sido diseñados. Por ello, para la realización de este proyecto de validación, se han aplicado diversas metodologías de citometría de flujo, que permiten realizar unas pruebas de validación más precisas y fiables, con la finalidad de validar los anticuerpos óptimos para su uso en IVD y otorgarles la certificación CE-IVD. Entre estas metodologías se incluyen la preparación de las muestras, como se explica en la sección de Materiales y Métodos de la presente Tesis, la selección de las muestras adecuadas, la identificación y resolución de inconvenientes y, especialmente, el análisis de los datos.

Debido a los acuerdos de confidencialidad del propio proyecto, en esta Tesis se ha excluido la información sensible del mismo.

Entre los anticuerpos validados para uso en IVD, se incluyen marcadores de poblaciones leucocitarias, de la serie eritroide, de plaquetas y de cadenas Kappa y Lambda. De entre estos marcadores se encuentran algunos cuya expresión se localiza generalmente en muestras de sangre periférica y otros, cuya expresión se encuentra asociada a diferentes patologías o poblaciones celulares.

### 1.3 Selección de muestras patológicas

Para realizar la validación de anticuerpos para la obtención del certificado CE-IVD, es necesario disponer de muestras clínicas que expresen el marcador del anticuerpo que se busca validar.

Por una parte, cabe distinguir cuando se buscan validar marcadores de poblaciones comunes que se encuentran expresados de forma normal en todas las muestras de sangre periférica, como son el CD4, CD8, CD20 presentes en linfocitos, CD14 en monocitos y, CD16 en neutrófilos, entre otros marcadores<sup>226</sup>. En estos casos para realizar la validación pueden no ser necesarias muestras de pacientes con patologías específicas. Y, por otra parte, cuando se buscan validar marcadores de poblaciones minoritarias, como es CD123 presente en células dendríticas plasmacitoides y en células blásticas en la leucemia mieloide aguda<sup>227,228</sup>. De forma similar, en sangre periférica, el marcador CD1a se puede encontrar expresado en células dendríticas precursoras de células de Langerhans<sup>229</sup> y en las células blásticas en la leucemia aguda linfoblástica de células T<sup>230</sup>. Otro ejemplo es el marcador CD117, el cual se expresa mayoritariamente en leucemias mieloides agudas<sup>231</sup> mientras que en muestras no patológicas presenta una baja expresión. A su vez, el marcador CD103 es característico de la leucemia de células peludas o tricoleucemia<sup>232</sup> y, en linfocitos en muestras de sangre periférica no patológicas, presenta una baja expresión.

En estos casos, para realizar la validación se necesitan muestras de pacientes con patologías específicas.

### 1.4 Variables en el inmunofenotipado

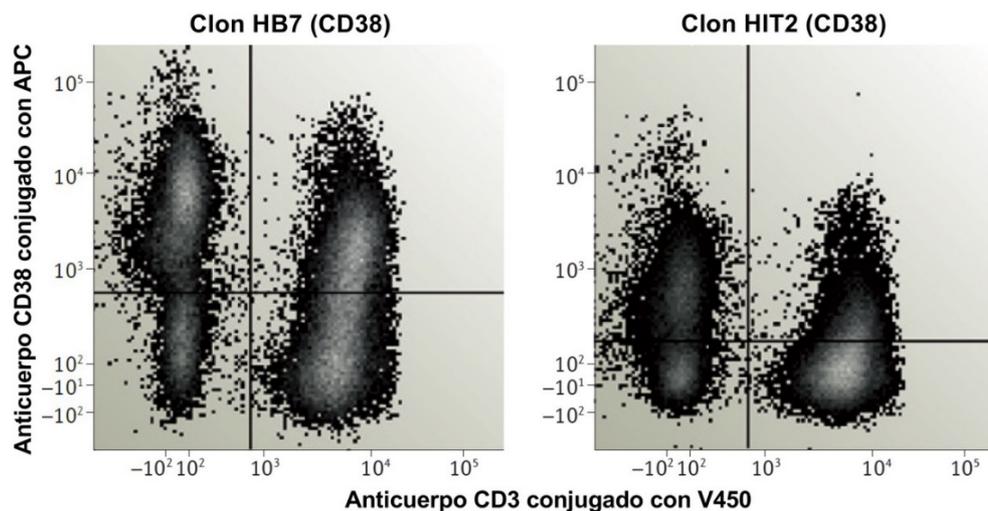
Un ejemplo para comprender el valor y la dificultad de la validación de anticuerpos monoclonales para su uso en IVD es el *Human Immunology Project* (HIP)<sup>233</sup>. Con el HIP se busca caracterizar los diversos estados del sistema inmunitario humano, es decir, los perfiles de las células inmunitarias antes y después de la infección, la vacunación y el tratamiento con un adyuvante, para así compararlos con el inmunofenotipo asociado a la patología y entender el sistema inmunitario y su regulación. Para poder alcanzar dicho

objetivo, es necesario realizar ensayos precisos y estandarizados para evitar o minimizar los artefactos técnicos. Por consiguiente, es necesario controlar ciertas variables existentes en el desarrollo de los experimentos de citometría de flujo, incluyendo los reactivos, la manipulación de la muestra, la configuración del equipo y el análisis de los datos.

El estudio de validación de anticuerpos para uso en IVD requiere en primer lugar la planificación del estudio de cada anticuerpo. Esta planificación incluye la selección de los anticuerpos competidores adecuados, que permitan comparar la efectividad del anticuerpo para validar y determinar si este es apto para su uso en IVD. Para ello se utilizan anticuerpos que ostentan el certificado IVD, CE-IVD, ASR o, en su defecto, RUO, con la premisa de que sean producidos por fabricantes que sigan las guías de buenas prácticas de fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practice*)<sup>234</sup>.

Para elegir qué anticuerpo utilizar como competidor, se deben tener en cuenta diversas características, pues pueden ser una fuente de variabilidad que afecte a los resultados. La primera de estas es que sea el mismo marcador, e idealmente: que el fluorocromo al que se encuentra conjugado presente una eficiencia cuántica similar, que el clon utilizado produzca anticuerpos que reconozcan el mismo epítipo y que sean del mismo isotipo. Por ejemplo, anticuerpos procedentes de clones diferentes pueden mostrar una separación diferente de la población positiva y negativa (**Figura 52**), de manera que afecten al porcentaje aparente de las células positivas, si estas se mezclan con las negativas debido a una escasa separación.

También se debe tener en cuenta que en ocasiones no estarán disponibles en el mercado los anticuerpos competidores que cumplan dichas características. Por lo tanto, se priorizará en el siguiente orden: marcador, fluorocromo, clon e isotipo.



**Figura 52. Patrones de marcaje del anticuerpo CD38 producido por dos clones diferentes (HB7 y HIT2). (Imagen adaptada de *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*<sup>74</sup>).**

Las muestras utilizadas fueron determinadas por el marcador del anticuerpo para validar, así como el tipo de muestra en el que se realiza el estudio clínico para el cual está destinado dicho anticuerpo, ya sea médula ósea o sangre periférica. Para reducir fuentes de variabilidad, las muestras se prepararon simultáneamente para ambos anticuerpos. En este punto, también se deben tener en cuenta otros factores como, por ejemplo, componentes de reactivos que afecten al epítipo objetivo, como el formaldehído, que pueda requerir el lavado de la muestra, o uniones inespecíficas de los anticuerpos.

También en la adquisición se mantuvo la misma configuración del citómetro para ambos anticuerpos, siendo ajustada según el anticuerpo competidor.

Otro factor de variabilidad que parece pasar más desapercibido es la subjetividad en el análisis de los datos, especialmente en los estudios de poblaciones minoritarias<sup>235</sup>. Un claro ejemplo de la variabilidad asociada al análisis se vio expuesto en un estudio *in silico* previo<sup>235</sup>. En dicho estudio se enviaron los datos obtenidos de la adquisición de 4 muestras procesadas con la metodología de mínima manipulación de la muestra<sup>236</sup> a 50 laboratorios para realizar el análisis y recuento de células CD34+. Los resultados reportados por los diferentes laboratorios mostraron una variabilidad en los resultados, que oscilaban desde un 5,52% a un 13,64% en el caso de eventos absolutos de células CD45+, y desde un 12,62% hasta un 58,72% en eventos CD34+<sup>235</sup>. Como indicaron los

autores, una posible solución para mitigar esta subjetividad del análisis es la realización de cursos profesionales específicos.

### 1.5 Estrategia de análisis

Para validar cada anticuerpo, se utilizó un marcador común en la población de interés a partir del cual poder comparar el anticuerpo competidor y el anticuerpo para validar. El marcador común escogido en los estudios de poblaciones leucocitarias fue el CD45. En el caso de las cadenas Kappa y Lambda, se añadieron los marcadores CD19 o CD20 como marcadores comunes adicionales. En estos casos, a partir de la expresión del marcador común y las características de dispersión de la luz, generalmente la dispersión lateral de la luz o la dispersión frontal en el caso de muestras leucémicas, se seleccionaba la población objetivo del anticuerpo a analizar. En el análisis de marcadores de plaquetas, no se utilizó un marcador común, sino las propiedades de dispersión de la luz para identificar el *clúster* de plaquetas y micropartículas como se mostró en la **Figura 18**. Y en el análisis del marcador CD34, se aplicó una aproximación basada en las recomendaciones de la ISHAGE como se mostró en la **Figura 19**.

Cabe mencionar que, como se muestra en los resultados del primer estudio de esta Tesis, la discriminación de los dobletes se realizó posteriormente a la selección de la población del marcador común y previo a la selección de la población específica del marcador de interés. Esta última selección se realizó en un gráfico que enfrentaba el marcador CD45 y el del anticuerpo para validar, pues generalmente se discriminan mejor las poblaciones enfrentando las fluorescencias, en comparación a enfrentar el marcador de interés, con la dispersión frontal o lateral de la luz.

También es recomendable utilizar la transformación biexponencial en los ejes, pues comprime la escala en los rangos más bajos, de manera que se obtiene una representación visual más precisa de las poblaciones que presentan una baja intensidad de la fluorescencia del marcador.

En el análisis de marcadores de poblaciones leucocitarias minoritarias, es recomendable seleccionar el *clúster* de la población de interés, según su expresión de CD45 y dispersión

de la luz, como en el caso de células blásticas las cuales presentan una menor expresión de CD45<sup>237</sup>.

Asimismo, conocer el nivel de expresión que presenta el marcador en la población objetivo y la eficiencia cuántica del fluorocromo utilizado, es relevante para la identificación de poblaciones positivas que presentan una baja intensidad de fluorescencia o un bajo ratio *signal-to-noise*. Para ello también es de utilidad aplicar ventanas de análisis booleano, para comparar la población de interés con poblaciones negativas, facilitando su identificación.

La superposición espectral<sup>238</sup> es otro punto para tener en cuenta, sin embargo, debido a que los marcajes utilizados en este estudio son de 2 anticuerpos (3 en la validación de las cadenas Kappa y Lambda) es un suceso altamente improbable y relativamente fácil de evitar, seleccionando anticuerpos de marcadores comunes (por ejemplo, CD45) conjugados con fluorocromos con los que no presente superposición espectral y realizando una compensación adecuada si fuese necesario<sup>239</sup>.

## **1.6 Criterios de aceptación de los reactivos**

Para poder otorgar el certificado de validación para uso en IVD, los anticuerpos estudiados tuvieron que cumplir con los criterios de aceptación que engloban los requerimientos de uso previsto, los requisitos de soporte y las necesidades del usuario. Se consideró que cada anticuerpo cumplía estos requisitos si, por una parte, la diferencia absoluta en el porcentaje de las células objetivo para el anticuerpo específico, para cada muestra válida, fue menor o igual al 5% entre el anticuerpo para validar y su respectivo anticuerpo de referencia y, por otra parte, si se ajustaba a las necesidades de un usuario de laboratorio clínico, según el responsable del estudio en el respectivo centro donde se realizaron las pruebas. Cabe mencionar que el anticuerpo CD117 PE-Cy7 demostró unas diferencias superiores al 5% entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia y, a pesar de ello, fue considerado válido para el marcaje CE-IVD. Esto fue debido a que el anticuerpo para validar discriminaba mejor la población objetivo en comparación al anticuerpo de referencia y permitía identificar correctamente la población objetivo.

Requisito de uso previsto:

- El reactivo está orientado al uso de diagnóstico *in vitro* para identificar células que expresan el antígeno humano en sangre periférica anticoagulada mediante el análisis de citometría de flujo.

Requisitos de soporte:

- El reactivo debe poder utilizarse en muestras de sangre periférica humana con cualquier tubo para muestras de sangre que contenga anticoagulante y esté disponible comercialmente.
- La concentración en cada vial ha de ser suficiente para permitir la identificación de la población positiva sobre el ruido de fondo, en 100 µL de muestra de sangre periférica con expresión normal o anormal del antígeno, para su uso en diagnóstico *in vitro*.
- El reactivo debe funcionar correctamente en un citómetro de flujo equipado adecuadamente, con el fin de realizar la adquisición de la muestra y el análisis de los datos.

Necesidades del usuario:

- El reactivo ha de permitir a los profesionales de la medicina identificar las células que expresan el antígeno humano en muestras de sangre periférica anticoagulada, mediante el análisis de citometría de flujo.
- El reactivo ha de estar listo para su uso por parte de los profesionales de la medicina.
- El reactivo debe permitir identificar las células que expresan el marcador de interés, preferiblemente mejor que los demás reactivos existentes.

## Resultados Estudio IV



Este estudio de validación de anticuerpos monoclonales para su marcado CE-IVD ha consistido en 8 fases (**Tabla 3**). En el momento de la redacción de esta tesis, el progreso de la validación asciende a 134 anticuerpos.

| Fase | Nº de anticuerpos |
|------|-------------------|
| 1-2  | 23                |
| 3    | 22                |
| 4    | 18                |
| 5    | 17                |
| 6    | 23                |
| 7    | 18                |
| 8    | 13                |

**Tabla 3. Anticuerpos validados para su uso en IVD en cada fase del estudio.**

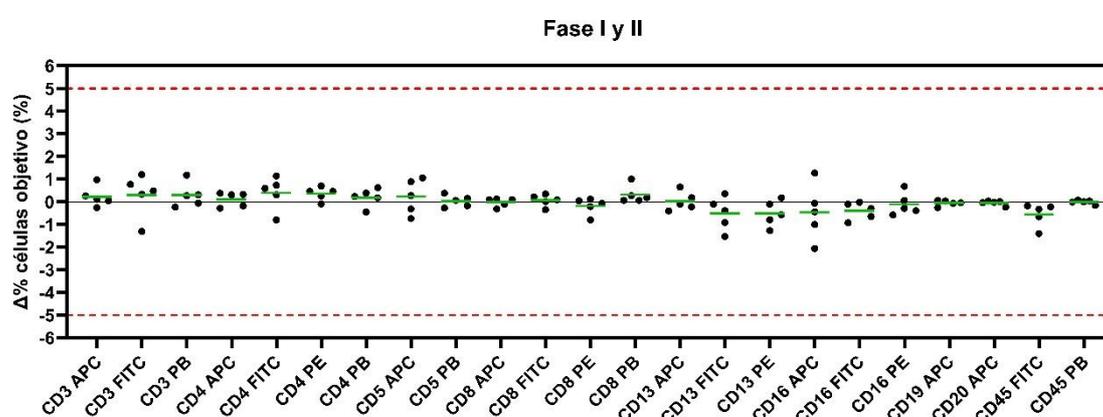
## 2.1 Fase I - II

Los 23 anticuerpos aprobados en la fase 1 - 2 cumplieron el requisito de permitir identificar la población de células que expresan el antígeno de interés con una diferencia sobre el porcentaje de células objetivo ( $\Delta\%co$ ), igual o inferior al 5%. Asimismo, cumplieron con los criterios de aceptación (Punto 1.6 Estudio IV) (**Tabla 4 y Figura 53**).

| No. | Anticuerpo | $\Delta\%$ células objetivo (%) |           |           |           |           | Criterios de aceptación                                  |                    |
|-----|------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|--------------------|
|     |            | Muestra 1                       | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | $\Delta\%$ células objetivo [ $\geq -5\%$ , $\leq 5\%$ ] | Conformidad de uso |
| 1   | CD3 APC    | +0,05                           | -0,25     | +0,11     | +0,26     | +0,97     | Apto   | Apto               |
| 2   | CD3 FITC   | +1,20                           | -1,30     | +0,34     | +0,48     | +0,77     | Apto   | Apto               |
| 3   | CD3 PacB   | +0,27                           | +1,18     | +0,31     | -0,06     | -0,23     | Apto   | Apto               |
| 4   | CD4 APC    | +0,33                           | -0,28     | -0,18     | +0,38     | +0,31     | Apto   | Apto               |
| 5   | CD4 FITC   | +0,74                           | +0,31     | -0,80     | +0,59     | +1,14     | Apto   | Apto               |
| 6   | CD4 PE     | +0,70                           | +0,25     | -0,09     | +0,47     | +0,47     | Apto   | Apto               |
| 7   | CD4 PacB   | -0,45                           | +0,63     | +0,18     | +0,39     | +0,24     | Apto   | Apto               |
| 8   | CD5 APC    | +0,89                           | -0,74     | +1,06     | -0,31     | +0,28     | Apto   | Apto               |
| 9   | CD5 PacB   | +0,15                           | -0,17     | +0,07     | -0,27     | +0,38     | Apto   | Apto               |
| 10  | CD8 APC    | +0,10                           | +0,09     | -0,11     | +0,13     | -0,31     | Apto   | Apto               |
| 11  | CD8 FITC   | +0,35                           | +0,09     | +0,22     | -0,35     | +0,02     | Apto   | Apto               |
| 12  | CD8 PE     | +0,12                           | -0,20     | -0,80     | +0,04     | -0,06     | Apto   | Apto               |
| 13  | CD8 PacB   | +1,01                           | +0,27     | +0,07     | +0,19     | +0,07     | Apto   | Apto               |
| 14  | CD13 APC   | -0,22                           | -0,40     | +0,65     | +0,19     | -0,11     | Apto   | Apto               |
| 15  | CD13 FITC  | -0,91                           | -0,11     | -0,39     | +0,36     | -1,53     | Apto   | Apto               |

|    |           |       |       |       |       |       |      |      |
|----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 16 | CD13 PE   | -0,79 | +0,18 | -0,10 | -1,27 | -0,57 | Apto | Apto |
| 17 | CD16 APC  | -2,06 | -0,44 | +1,27 | -1,00 | -0,06 | Apto | Apto |
| 18 | CD16 FITC | -0,30 | -0,92 | -0,64 | -0,02 | -0,10 | Apto | Apto |
| 19 | CD16 PE   | +0,06 | -0,58 | -0,29 | -0,39 | +0,69 | Apto | Apto |
| 20 | CD19 APC  | -0,04 | -0,25 | +0,07 | +0,03 | -0,07 | Apto | Apto |
| 21 | CD20 APC  | -0,02 | +0,02 | -0,23 | +0,03 | -0,03 | Apto | Apto |
| 22 | CD45 FITC | -0,32 | -0,22 | -0,66 | -1,40 | -0,18 | Apto | Apto |
| 23 | CD45 PacB | +0,08 | +0,01 | +0,03 | -0,15 | -0,01 | Apto | Apto |

**Tabla 4. Resumen de las diferencias absolutas del porcentaje de las células objetivo ( $\Delta\%co$ ) obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 23 anticuerpos de la Fase I.**



**Figura 53. Representación gráfica de las  $\Delta\%co$  obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 23 anticuerpos de la Fase I. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de  $\pm 5\%$  de  $\Delta\%co$ . Las líneas verdes representan el promedio de la  $\Delta\%co$  de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.**

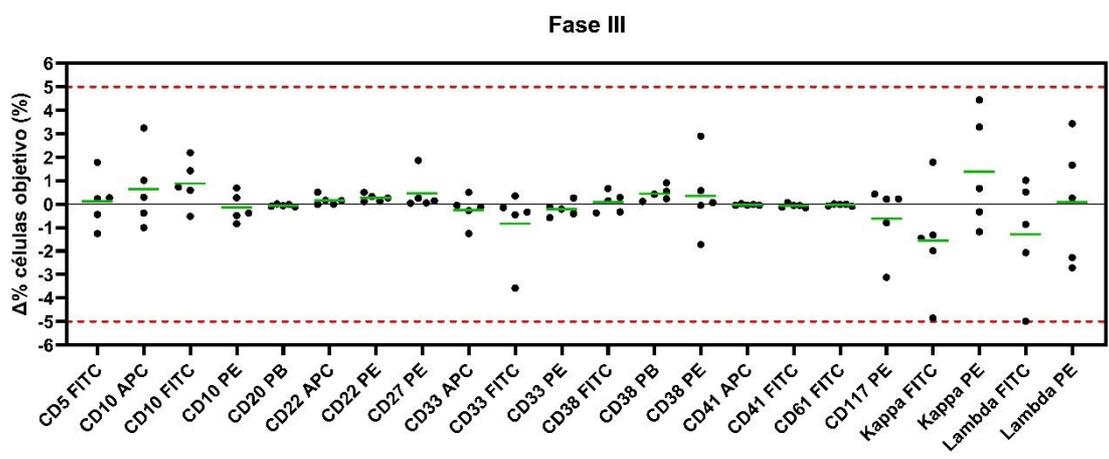
## 2.2 Fase III

Los 22 anticuerpos monoclonales aprobados en la fase III cumplieron los criterios de aceptación (Punto 1.6 Estudio IV) de igual manera que los anticuerpos aprobados en las fases previas (Tabla 5 y Figura 54).

| No. | Anticuerpo | $\Delta\%$ células objetivo (%) |           |           |           |           | Criterios de aceptación                             |                    |
|-----|------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|--------------------|
|     |            | Muestra 1                       | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | $\Delta\%$ células objetivo $[\geq -5\%, \leq 5\%]$ | Conformidad de uso |
| 1   | CD5 FITC   | +0,27                           | +0,23     | -1,25     | +1,78     | -0,44     | Apto  | Apto               |
| 2   | CD10 APC   | +0,30                           | -1,00     | -0,38     | +1,02     | +3,24     | Apto  | Apto               |
| 3   | CD10 FITC  | +1,42                           | +2,19     | -0,52     | +0,73     | +0,59     | Apto  | Apto               |
| 4   | CD10 PE    | -0,38                           | +0,27     | -0,84     | +0,69     | -0,48     | Apto  | Apto               |

|    |             |       |       |       |       |       |      |      |
|----|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 5  | CD20 PacB   | +0,01 | -0,12 | -0,09 | -0,07 | -0,02 | Apto | Apto |
| 6  | CD22 APC    | +0,51 | -0,01 | ±0,00 | +0,16 | +0,15 | Apto | Apto |
| 7  | CD22 PE     | +0,13 | +0,26 | +0,32 | +0,11 | +0,50 | Apto | Apto |
| 8  | CD27 PE     | +1,86 | +0,05 | +0,04 | +0,14 | +0,25 | Apto | Apto |
| 9  | CD33 APC    | -1,25 | -0,13 | -0,05 | -0,28 | +0,50 | Apto | Apto |
| 10 | CD33 FITC   | -3,57 | -0,34 | -0,14 | +0,35 | -0,45 | Apto | Apto |
| 11 | CD33 PE     | -0,12 | +0,26 | -0,58 | -0,21 | -0,41 | Apto | Apto |
| 12 | CD38 FITC   | +0,67 | -0,33 | +0,29 | +0,14 | -0,37 | Apto | Apto |
| 13 | CD38 PacB   | +0,23 | +0,42 | +0,12 | +0,54 | +0,91 | Apto | Apto |
| 14 | CD38 PE     | +2,90 | -0,05 | -1,72 | +0,07 | +0,58 | Apto | Apto |
| 15 | CD41 APC    | -0,05 | -0,02 | -0,05 | -0,04 | +0,02 | Apto | Apto |
| 16 | CD41 FITC   | +0,07 | -0,06 | -0,06 | -0,13 | -0,15 | Apto | Apto |
| 17 | CD61 FITC   | +0,01 | -0,02 | -0,09 | -0,08 | ±0,00 | Apto | Apto |
| 18 | CD117 PE    | +0,43 | -3,12 | +0,22 | +0,21 | -0,80 | Apto | Apto |
| 19 | Kappa FITC  | -1,45 | -1,31 | -1,98 | +1,79 | -4,85 | Apto | Apto |
| 20 | Kappa PE    | +3,29 | +4,44 | -1,18 | +0,67 | -0,33 | Apto | Apto |
| 21 | Lambda FITC | -2,07 | -4,99 | +1,02 | -0,86 | +0,52 | Apto | Apto |
| 22 | Lambda PE   | +0,26 | -2,27 | +1,66 | -2,71 | +3,43 | Apto | Apto |

**Tabla 5. Resumen de las Δ%co obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 22 anticuerpos de la Fase III.**



**Figura 54. Representación gráfica de las Δ%co obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 22 anticuerpos de la Fase III. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de ±5% de Δ%co. Las líneas verdes representan el promedio de la Δ%co de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.**

## 2.3 Fase IV

De los 18 anticuerpos monoclonales testados en la fase IV, 17 cumplieron los criterios de aceptación y uno no cumplió con las necesidades del usuario incluidas en los criterios de aceptación (Punto 1.6 Estudio IV) (**Tabla 6** y **Figura 55**).

Los anticuerpos testados para el marcador CD56 en esta fase del estudio (CD56 APC, CD56 FITC y CD56 PE) mostraron un rendimiento no equivalente al de sus respectivos anticuerpos de referencia, además de un elevado ruido de fondo y una separación insuficiente entre las poblaciones positivas y negativas. Tras el análisis de los datos, se determinó que los efectos observados fueron posiblemente debidos a una elevada unión inespecífica de los anticuerpos a las células negativas y/o a una baja afinidad de estos al marcador a evaluar, dependiente del agente de la solución de lisis y de la concentración de los anticuerpos. Por lo tanto, en este caso se aplicó una modificación del protocolo de preparación de las muestras, incluyendo un paso de lavado de las muestras después del paso de lisis. Bajo esta condición, el rendimiento de los anticuerpos fue equivalente al de los respectivos anticuerpos de referencia, mostrando una diferencia del porcentaje de células objetivo inferior al 5% en todas las muestras. También cumplieron con los requisitos de conformidad de uso, a excepción del anticuerpo CD56 FITC, por lo que este último requirió de una evaluación adicional por otros expertos clínicos.

| No. | Anticuerpo       | Δ% células objetivo (%) |           |           |           |           | Criterios de aceptación          |                    |
|-----|------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------------------|--------------------|
|     |                  | Muestra 1               | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | Δ% células objetivo [≥-5%, ≤ 5%] | Conformidad de uso |
| 1   | CD2 PE-Cy7       | +0,12                   | +0,44     | -0,48     | +0,18     | +0,36     | Apto                             | Apto               |
| 2   | CD3 APC-Cy7      | +0,40                   | +0,39     | -0,38     | +0,09     | +1,07     | Apto                             | Apto               |
| 3   | CD4 APC-Cy7      | +0,32                   | +0,30     | +0,45     | +0,57     | +0,32     | Apto                             | Apto               |
| 4   | CD4 PE-Cy7       | +0,33                   | -0,05     | +0,05     | -0,18     | -0,57     | Apto                             | Apto               |
| 5   | CD4 PerCP-Cy5.5  | +0,06                   | +0,02     | +0,55     | +0,23     | -0,24     | Apto                             | Apto               |
| 6   | CD5 PE-Cy7       | +0,86                   | -0,51     | -0,02     | ±0,00     | +0,03     | Apto                             | Apto               |
| 7   | CD8 PerCP        | -0,09                   | +0,01     | -0,33     | ±0,00     | -0,16     | Apto                             | Apto               |
| 8   | CD8 PerCP-Cy5.5  | -0,40                   | -0,03     | +0,09     | +0,11     | +0,32     | Apto                             | Apto               |
| 9   | CD13 PE-Cy7      | +0,02                   | +0,37     | -2,12     | -1,36     | -0,90     | Apto                             | Apto               |
| 10  | CD19 PE-Cy7      | +0,02                   | +0,06     | +0,04     | +0,01     | +0,11     | Apto                             | Apto               |
| 11  | CD19 PerCP-Cy5.5 | -0,33                   | -0,21     | -0,09     | -0,23     | -0,48     | Apto                             | Apto               |
| 12  | CD20 PerCP-Cy5.5 | -0,17                   | -0,20     | -0,02     | -0,04     | -0,38     | Apto                             | Apto               |
| 13  | CD33 PE-Cy7      | -0,33                   | +0,19     | -0,15     | -0,38     | +0,12     | Apto                             | Apto               |

|    |                  |       |       |       |       |       |      |            |
|----|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------------|
| 14 | CD33 PerCP-Cy5.5 | +0,04 | -0,41 | +1,13 | +0,38 | +0,48 | Apto | Apto       |
| 15 | CD41 PE          | ±0,00 | -0,07 | -0,03 | +0,04 | -0,02 | Apto | Apto       |
| 16 | CD56 APC         | +0,06 | -1,30 | -0,67 | -0,50 | -0,60 | Apto | Apto       |
| 17 | CD56 FITC        | -3,12 | -1,38 | -1,11 | -2,44 | -0,40 | Apto | Pendiente* |
| 18 | CD56 PE          | -0,82 | -1,23 | -0,51 | -0,37 | -0,67 | Apto | Apto       |

Tabla 6. Resumen de las  $\Delta\%$ co obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase IV.

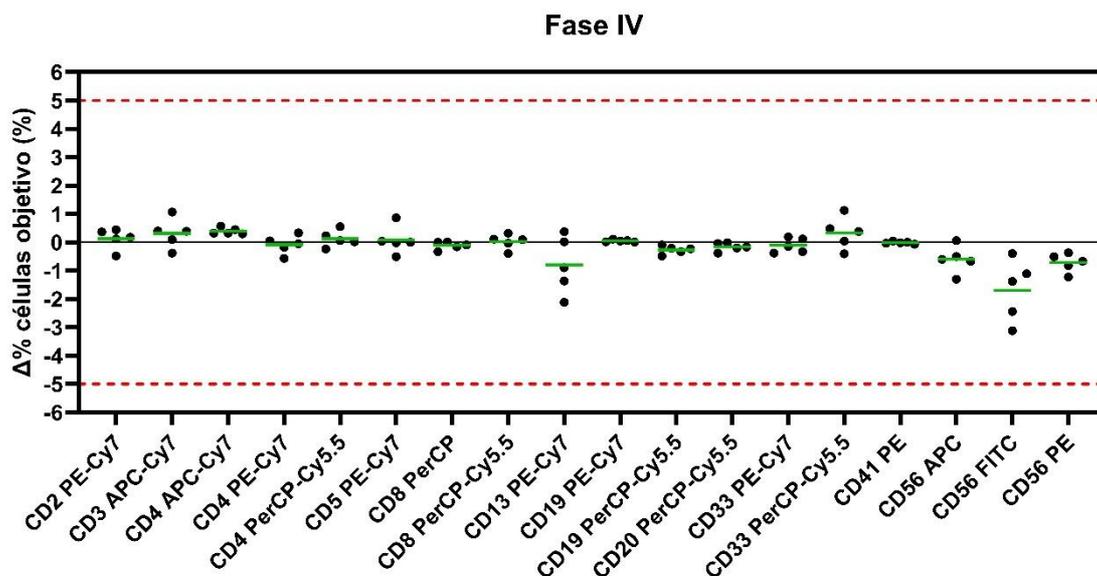


Figura 55. Representación gráfica de las  $\Delta\%$ co obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase IV. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de  $\pm 5\%$  de  $\Delta\%$ co. Las líneas verdes representan el promedio de la  $\Delta\%$ co de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.

## 2.4 Fase V

Los 17 anticuerpos monoclonales testados en la fase V cumplieron criterios de aceptación, y 16 de ellos mostraron una diferencia absoluta en el porcentaje de células objetivo obtenido con el anticuerpo competidor y el anticuerpo para validar, igual o inferior al 5% (Punto 1.6 Estudio IV) (Tabla 7 y Figura 57).

Los anticuerpos CD103 FITC y el CD117 PE-Cy7 requirieron un estudio más extenso debido a los primeros resultados obtenidos.

En el caso del anticuerpo anti CD103 FITC, doce de las catorce muestras evaluadas mostraron una expresión del marcador inferior al 1% por lo que fueron evaluadas como muestras no patológicas. En este caso, debido a que en las catorce muestras el rendimiento del anticuerpo para validar fue comparable al anticuerpo de referencia y las muestras clínicamente positivas para este marcador son minoritarias, se concluyó que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

En el caso del anticuerpo anti CD117 PE-Cy7, debido a que el anticuerpo para evaluar presentó una mayor resolución al discriminar las células positivas de las negativas respecto el anticuerpo de referencia, en dos de las primeras cinco muestras evaluadas las diferencias en el porcentaje de células objetivo eran superiores al 5% (**Figura 56**). Por este motivo, se evaluaron tres muestras adicionales y se concluyó que cumplió con los criterios de aceptación. Cabe mencionar que, como se mencionó anteriormente, en el análisis de estas muestras se enfrentó el marcador CD45 a la FSC en lugar de la SSC debido a que eran muestras leucémicas.

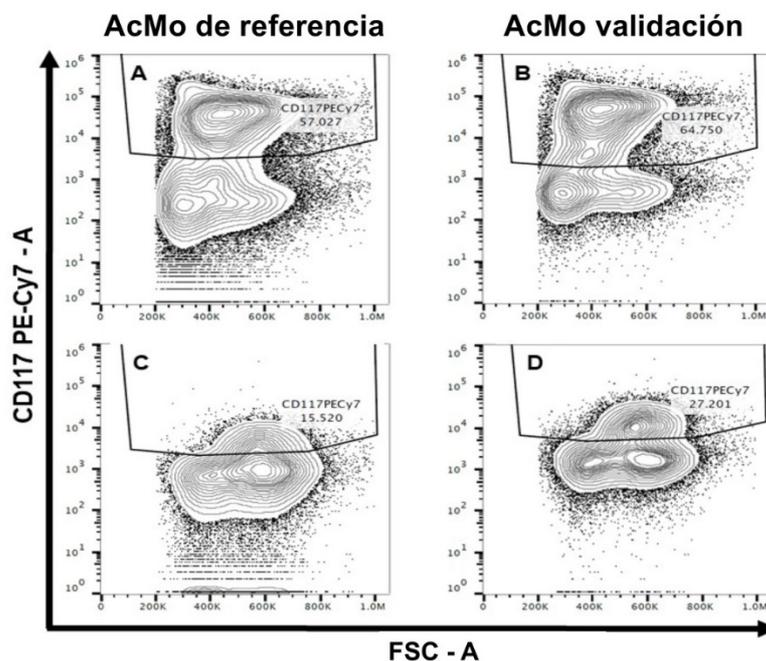


Figura 56. Análisis de contorno sobre la población CD45+ y singletes (gráficos no mostrados) para identificar las células CD117+ en la primera (A, B) y segunda muestra (C, D), comparando el porcentaje de poblaciones positivas utilizando el anticuerpo de referencia (A, C) y el anticuerpo para validar (B, D).

Según las ocho muestras evaluadas, se concluyó que el anticuerpo para validar proporcionó una resolución comparable o mejor de las células objetivo positivas y negativas, respecto al anticuerpo de referencia. Por lo tanto, se concluyó que el rendimiento del anticuerpo CD117 PE-Cy7 es aceptable.

Finalmente, los 17 anticuerpos de la fase V fueron evaluados como aptos para el marcado CE-IVD.

| No.   | Anticuerpo       | $\Delta\%$ células objetivo (%) |            |            |            |            | Criterios de aceptación                                  |                    |
|-------|------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|--|--------------------|
|       |                  | Muestra 1                       | Muestra 2  | Muestra 3  | Muestra 4  | Muestra 5  | $\Delta\%$ células objetivo [ $\geq -5\%$ , $\leq 5\%$ ] | Conformidad de uso |
| 1     | CD2 FITC         | -0,17                           | +0,45      | +0,73      | +0,18      | +0,43      | Apto   | Apto               |
| 2     | CD3 AF700        | -0,71                           | +0,17      | +0,36      | -0,24      | -0,49      | Apto   | Apto               |
| 3     | CD7 FITC         | +0,17                           | -0,84      | +0,05      | +0,01      | +0,46      | Apto   | Apto               |
| 4     | CD7 PE           | -0,25                           | +0,04      | -0,14      | +0,42      | -0,08      | Apto   | Apto               |
| 5     | CD14 PE          | -0,09                           | +0,32      | +0,07      | +0,18      | -0,05      | Apto   | Apto               |
| 6     | CD20 PE-Cy7      | -0,08                           | +0,02      | -0,01      | +0,04      | -0,10      | Apto   | Apto               |
| 7     | CD45 APC         | +0,06                           | +0,05      | +0,35      | +0,25      | +0,11      | Apto   | Apto               |
| 8     | CD45 APC-Cy7     | -0,02                           | +0,06      | -0,17      | +0,04      | +0,02      | Apto   | Apto               |
| 9     | CD45 PE-Cy7      | +0,04                           | +0,02      | +0,02      | $\pm 0,00$ | +0,05      | Apto   | Apto               |
| 10    | CD45 PerCP-Cy5.5 | +0,05                           | +0,03      | -0,01      | $\pm 0,00$ | +0,01      | Apto   | Apto               |
| 11    | CD79a PE         | -0,05                           | -0,04      | +0,04      | -0,26      | -0,41      | Apto   | Apto               |
| 12    | CD103 FITC       | Muestra 1                       | Muestra 2  | Muestra 3  | Muestra 4  | Muestra 5  | Apto con excepción                                       | Apto               |
|       |                  | -0,12                           | +0,01      | -0,32      | $\pm 0,00$ | +0,01      |  |                    |
|       |                  | Muestra 6                       | Muestra 7  | Muestra 8  | Muestra 9  | Muestra 10 |  |                    |
|       |                  | -0,84                           | -0,01      | -0,02      | -0,03      | -0,03      |  |                    |
|       |                  | Muestra 11                      | Muestra 12 | Muestra 13 | Muestra 14 |            |  |                    |
| +0,01 | $\pm 0,00$       | -0,01                           | -0,16      |            |            |            |  |                    |
| 13    | CD117 PE-Cy7     | Muestra 1                       | Muestra 2  | Muestra 3  | Muestra 4  | Muestra 5  | Apto con excepción                                       | Apto               |
|       |                  | -0,66                           | +7,72      | +11,68     | +2,62      | +1,89      |  |                    |
|       |                  | Muestra 6                       | Muestra 7  | Muestra 8  |            |            |  |                    |
|       |                  | +0,84                           | +0,46      | +0,76      |            |            |  |                    |
| 14    | Kappa APC        | -0,76                           | -2,48      | -0,18      | +0,44      | -0,49      | Apto   | Apto               |
| 15    | Kappa PacB       | +4,94                           | +0,22      | +3,00      | -0,13      | +3,48      | Apto   | Apto               |
| 16    | Lambda APC       | -4,69                           | -0,35      | -2,58      | -0,39      | -4,52      | Apto   | Apto               |
| 17    | MPO FITC         | -0,76                           | +1,83      | +0,13      | +0,25      | -0,11      | Apto   | Apto               |

**Tabla 7. Resumen de las  $\Delta\%$ co obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 17 anticuerpos de la Fase V.**

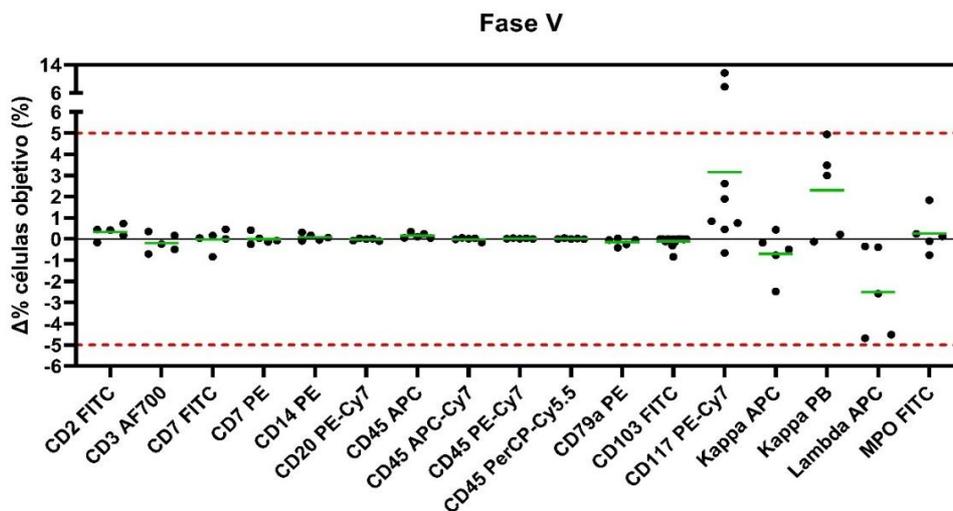


Figura 57. Representación gráfica de las  $\Delta\%$ co obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 17 anticuerpos de la Fase V. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de  $\pm 5\%$  de  $\Delta\%$ co. Las líneas verdes representan el promedio de la  $\Delta\%$ co de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.

## 2.5 Fase VI

Los 23 anticuerpos monoclonales probados en la fase VI cumplieron los criterios de aceptación mostrando una diferencia absoluta en el porcentaje de células objetivo obtenido con el anticuerpo competidor y el anticuerpo para validar, igual o inferior al 5%; y los requisitos de conformidad de uso (Punto 1.6 Estudio IV) (**Tabla 8** y **Figura 58**).

En esta fase se aplicaron modificaciones en el procesamiento de algunas muestras respecto al protocolo general, como se explica a continuación.

En el testeo de los marcadores CD23 PE y CD103 APC, se aplicó el proceso de lisis con lavado en lugar de lisis sin lavado, para reducir el ruido de fondo e incrementar el porcentaje de células positivas detectables. Una vez realizada esta modificación, se concluyó que el rendimiento de ambos anticuerpos es aceptable.

En el testeo de los marcadores CD20 PE, HLA-DR PE, CD23 PE y CD27 FITC, se realizaron adquisiciones con diferente voltaje en el canal en el que se detectaba el anticuerpo de referencia y el anticuerpo para validar, debido a la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre ambos. Los análisis de diversas de estas muestras mostraron una buena separación entre las poblaciones positivas y negativas, en este caso se

consideraron como mediciones aceptables para evaluar el rendimiento del anticuerpo. Las adquisiciones en las que se consideró que, la separación entre las poblaciones positivas y negativas no permitía diferenciar ambas poblaciones, se realizaron muestras adicionales. Después de realizar las pruebas adicionales, se concluyó que el rendimiento de los cuatro anticuerpos es aceptable.

En el testeo del marcador CD27 FITC, tres de las cinco muestras fueron preparadas cuando el anticuerpo para validar había superado su fecha límite de uso. Aun así, no se observó ningún efecto en el rendimiento del anticuerpo, por lo que se concluyó que las mediciones fueron aceptables para la evaluación del anticuerpo y que el rendimiento de este es aceptable.

| No. | Anticuerpo        | $\Delta\%$ células objetivo (%) |           |            |           |            | Criterios de aceptación                                     |                    |
|-----|-------------------|---------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|---|--------------------|
|     |                   | Muestra 1                       | Muestra 2 | Muestra 3  | Muestra 4 | Muestra 5  | $\Delta\%$ células objetivo<br>[ $\geq -5\%$ , $\leq 5\%$ ] | Conformidad de uso |
| 1   | CD2 PE            | -0,44                           | -0,22     | +0,18      | -0,09     | +0,45      | Apto  | Apto               |
| 2   | CD2 APC           | +0,60                           | -0,10     | +0,71      | -0,03     | +0,18      | Apto  | Apto               |
| 3   | CD3 PE-Cy7        | +0,20                           | +0,10     | +0,43      | -0,28     | +0,69      | Apto  | Apto               |
| 4   | CD7 APC           | -0,19                           | -0,20     | +0,43      | -0,93     | +0,78      | Apto  | Apto               |
| 5   | CD8 PacO          | +1,48                           | +1,30     | +1,31      | +0,67     | +2,20      | Apto  | Apto               |
| 6   | CD8 AF700         | +0,57                           | +0,52     | +0,29      | +0,26     | +0,30      | Apto  | Apto               |
| 7   | CD14 FITC         | -0,07                           | +0,16     | +0,02      | -0,01     | $\pm 0,00$ | Apto  | Apto               |
| 8   | CD16 PacO         | -1,48                           | -0,51     | -0,69      | -0,73     | -0,08      | Apto  | Apto               |
| 9   | CD16 PerCP        | -0,85                           | +0,54     | -0,15      | -0,37     | +0,28      | Apto  | Apto               |
| 10  | CD19 PE           | +0,50                           | +0,05     | -0,04      | +0,13     | $\pm 0,00$ | Apto  | Apto               |
| 11  | CD19 AF700        | +0,52                           | +0,04     | -0,10      | +0,16     | +0,01      | Apto  | Apto               |
| 12  | CD20 PE           | -0,16                           | -0,03     | $\pm 0,00$ | -0,10     | $\pm 0,00$ | Apto  | Apto               |
| 13  | CD23 PE           | -0,25                           | -0,33     | -0,06      | +0,13     | -0,23      | Apto  | Apto               |
| 14  | CD27 PacB         | +0,18                           | -0,08     | -0,04      | -0,21     | -0,14      | Apto  | Apto               |
| 15  | CD27 FITC         | +0,54                           | +1,42     | -0,15      | +1,20     | +0,88      | Apto  | Apto               |
| 16  | CD45 PacO         | +0,01                           | +0,03     | +0,06      | +0,21     | -0,23      | Apto  | Apto               |
| 17  | CD79a APC         | -0,21                           | -0,20     | +0,07      | -0,30     | +0,11      | Apto  | Apto               |
| 18  | CD103 APC         | -0,18                           | -0,05     | -0,01      | -0,02     | -0,05      | Apto  | Apto               |
| 19  | CD123 PerCP-Cy5.5 | +0,04                           | +0,12     | $\pm 0,00$ | +0,02     | -0,04      | Apto  | Apto               |
| 20  | HLA-DR PacB       | -0,46                           | -0,41     | +0,22      | +0,50     | +0,21      | Apto  | Apto               |
| 21  | HLA-DR FITC       | +0,63                           | +0,03     | +1,09      | -0,30     | +0,07      | Apto  | Apto               |
| 22  | HLA-DR PE         | -0,07                           | -0,01     | +0,28      | -2,09     | -0,04      | Apto  | Apto               |
| 23  | MPO PE            | -0,13                           | -0,45     | -0,40      | -0,26     | +0,45      | Apto  | Apto               |

**Tabla 8. Resumen de las  $\Delta\%$ co obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 23 anticuerpos de la Fase VI.**

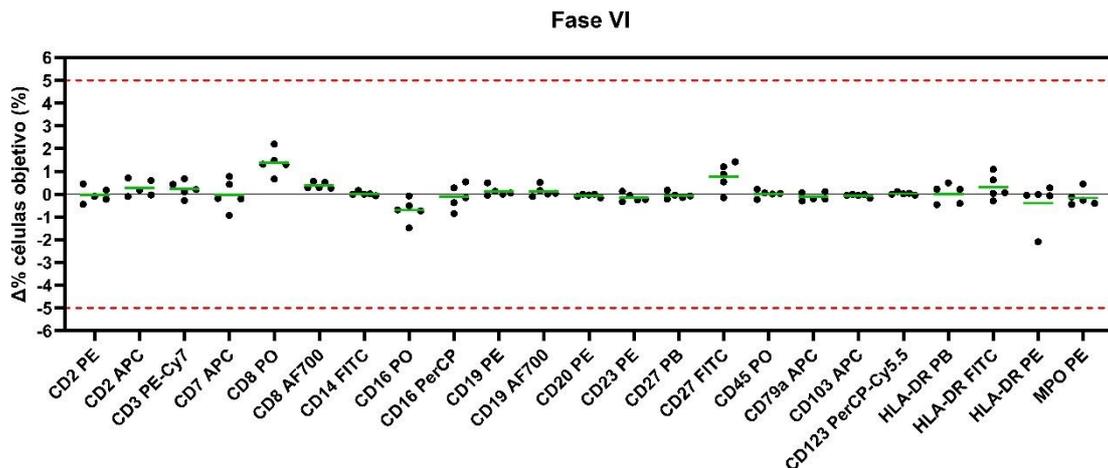


Figura 58. Representación gráfica de las  $\Delta\%co$  obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 23 anticuerpos de la Fase VI. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de  $\pm 5\%$  de  $\Delta\%co$ . Las líneas verdes representan el promedio de la  $\Delta\%co$  de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.

## 2.6 Fase VII

En la fase VII se evaluaron 18 anticuerpos monoclonales, de los cuales 17 cumplieron los criterios de aceptación mostrando una diferencia absoluta en el porcentaje de células objetivo, obtenido con el anticuerpo competidor y el anticuerpo para validar, igual o inferior al 5% y, asimismo, cumpliendo los requisitos de conformidad de uso (Punto 1.6 Estudio IV) (**Tabla 9** y **Figura 59**). El anticuerpo restante no cumplió los requisitos de conformidad de uso.

En esta fase también se aplicaron modificaciones en el procesamiento de algunas muestras respecto al protocolo general, como se explica a continuación.

En el testeo del marcador CD38 PerCP-Cy5.5, una de las muestras se adquirió con un voltaje diferente en el canal en el que se detectaba el anticuerpo de referencia y el anticuerpo para validar, al comparar entre ambos. Debido a que la separación entre las células positivas y el ruido de fondo no permitía discriminarlas, se realizó una prueba adicional y se concluyó que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

En el testeo de los marcadores CD5 PerCP-Cy5.5, CD10 PE-DyLight594, CD13 PerCP-Cy5.5, CD79a PerCP-Cy5.5 y CD103 PE, se realizó cuando el anticuerpo para validar había

superado su fecha límite de uso. En el caso del anticuerpo CD13 PerCP-Cy5.5, se dispuso de un nuevo vial, por lo que se realizaron cinco nuevas pruebas, sustituyendo a las cinco previas. De forma similar a lo sucedido en la fase VI, no se observó ningún efecto en el rendimiento de los anticuerpos, concluyendo que el rendimiento de estos anticuerpos es aceptable.

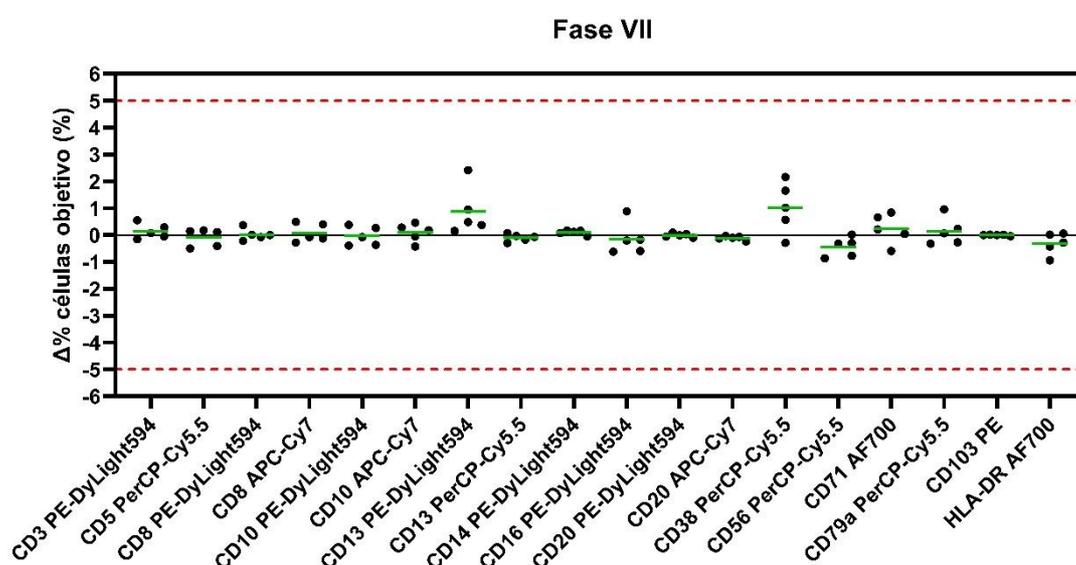
En el testeo de los marcadores CD3 PE-DyLight594, CD8 PE-DyLight594, CD10 PE-DyLight594, CD10 APC-Cy7, CD13 PE-DyLight594, CD14 PE-DyLight594, CD16 PE-DyLight594 y CD20 PE-DyLight594, no se dispuso de anticuerpos de referencia conjugados al mismo fluorocromo, por lo tanto, se tuvieron que utilizar anticuerpos de referencia conjugados a fluorocromos análogos.

En el testeo del marcador CD71 AF700 se evaluó su rendimiento en poblaciones leucocitarias y eritrocitarias, por lo que, en esta segunda se eliminó el procedimiento de lisis de eritrocitos y en ambos casos cumplió los requisitos de aceptación. Debido a que el análisis sobre eritrocitos omite el paso de la lisis, se decidió utilizar únicamente los resultados referentes a leucocitos para la evaluación del rendimiento del anticuerpo.

| No. | Anticuerpo         | $\Delta\%$ células objetivo (%) |            |           |           |           | Criterios de aceptación                                  |                    |
|-----|--------------------|---------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|--|--------------------|
|     |                    | Muestra 1                       | Muestra 2  | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | $\Delta\%$ células objetivo [ $\geq -5\%$ , $\leq 5\%$ ] | Conformidad de uso |
| 1   | CD3 PE-DyLight594  | +0,08                           | +0,29      | -0,15     | -0,05     | +0,55     | Apto   | Apto               |
| 2   | CD5 PerCP-Cy5.5    | -0,41                           | +0,18      | -0,50     | +0,11     | +0,14     | Apto   | Apto               |
| 3   | CD8 PE-DyLight594  | -0,22                           | $\pm 0,00$ | +0,01     | +0,37     | -0,08     | Apto   | Apto               |
| 4   | CD8 APC-Cy7        | +0,49                           | -0,13      | +0,40     | -0,28     | -0,08     | Apto   | Apto               |
| 5   | CD10 PE-DyLight594 | -0,08                           | -0,39      | -0,36     | +0,26     | +0,38     | Apto   | Apto               |
| 6   | CD10 APC-Cy7       | -0,42                           | +0,46      | -0,05     | +0,18     | +0,28     | Apto   | Apto               |
| 7   | CD13 PE-DyLight594 | +0,95                           | +2,41      | +0,37     | +0,48     | +0,15     | Apto   | Apto               |
| 8   | CD13 PerCP-Cy5.5   | -0,30                           | -0,17      | +0,08     | -0,07     | -0,03     | Apto   | Apto               |
| 9   | CD14 PE-DyLight594 | +0,08                           | +0,12      | -0,05     | +0,17     | +0,16     | Apto   | Apto               |
| 10  | CD16 PE-DyLight594 | -0,17                           | +0,88      | -0,59     | -0,62     | -0,20     | Apto   | Apto               |
| 11  | CD20 PE-DyLight594 | -0,01                           | -0,06      | +0,03     | +0,09     | -0,10     | Apto   | Apto               |
| 12  | CD20 APC-Cy7       | -0,24                           | -0,07      | -0,10     | -0,03     | -0,13     | Apto   | Apto               |
| 13  | CD38 PerCP-Cy5.5   | +1,65                           | +0,57      | +2,16     | +1,02     | -0,29     | Apto   | Apto               |
| 14  | CD56 PerCP-Cy5.5   | -0,30                           | -0,86      | -0,77     | -0,31     | +0,02     | Apto   | No apto            |

|    |                   |       |       |       |       |       |      |      |
|----|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 15 | CD71 AF700        | +0,04 | +0,66 | -0,59 | +0,21 | +0,84 | Apto | Apto |
| 16 | CD79a PerCP-Cy5.5 | +0,96 | -0,27 | +0,07 | -0,32 | +0,24 | Apto | Apto |
| 17 | CD103 PE          | +0,01 | -0,04 | ±0,00 | +0,02 | ±0,00 | Apto | Apto |
| 18 | HLA-DR AF700      | +0,02 | -0,28 | -0,42 | +0,06 | -0,94 | Apto | Apto |

**Tabla 9. Resumen de las Δ%co obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase VII.**



**Figura 59. Representación gráfica de las Δ%co obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase VII. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de ±5% de Δ%co. Las líneas verdes representan el promedio de la Δ%co de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.**

## 2.7 Fase VIII

Los 13 anticuerpos monoclonales probados en la fase VIII cumplieron los criterios de aceptación mostrando una diferencia absoluta en el porcentaje de células objetivo obtenido con el anticuerpo competidor y el anticuerpo para validar, igual o inferior al 5%; y los requisitos de conformidad de uso (Punto 1.6 Estudio IV) (**Tabla 10 y Figura 61**).

En esta fase también se aplicaron modificaciones en el procesamiento de algunas muestras respecto al protocolo general, como se explica a continuación.

En el testeo de los marcadores CD19 PE-DyLight594, CD23 PE-DyLight594, CD34 PE-DyLight594, CD38 APC-Cy7, CD56 PE-DyLight594, CD117 AF700 y CD117 APC-Cy7, no se

dispuso de anticuerpos de referencia conjugados al mismo fluorocromo, por lo tanto, se tuvieron que utilizar anticuerpos de referencia conjugados a fluorocromos análogos.

En el testeo del marcador CD10 AF700, no se detectó la población objetivo con el anticuerpo de referencia ni el anticuerpo para validar al utilizar el anticuerpo CD45 PerCP-Cy5.5, debido posiblemente a la superposición espectral entre ambos fluorocromos. Por lo tanto, se adquirieron cinco muestras adicionales utilizando el anticuerpo CD45 FITC, cumpliendo con los criterios de aceptación y concluyendo que el rendimiento del anticuerpo es aceptable. Pruebas internas adicionales de la empresa, con los anticuerpos CD45 Pacific Blue, CD45 FITC y CD45 PerCP-Cy5.5 reprodujeron los resultados reportados.

En el testeo del marcador CD11b FITC, se obtuvieron diferentes patrones de tinción tanto con el anticuerpo de referencia como con el anticuerpo para validar. Según Origene y BioRad, los anticuerpos obtenidos del mismo clon del anticuerpo utilizado reconocen un epítipo sensible a la fijación con formaldehído. Por lo tanto, se realizaron cinco adquisiciones adicionales sustituyendo la solución de lisis basada en formaldehído, por una solución de cloruro de amonio (**Figura 60**) y se concluyó que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

En el testeo del marcador CD19 PE-DyLight594, una de las muestras mostró una intensidad de marcaje de la población objetivo muy reducida en ambos anticuerpos, por lo tanto, se realizó la adquisición de dos muestras adicionales y se concluyó que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

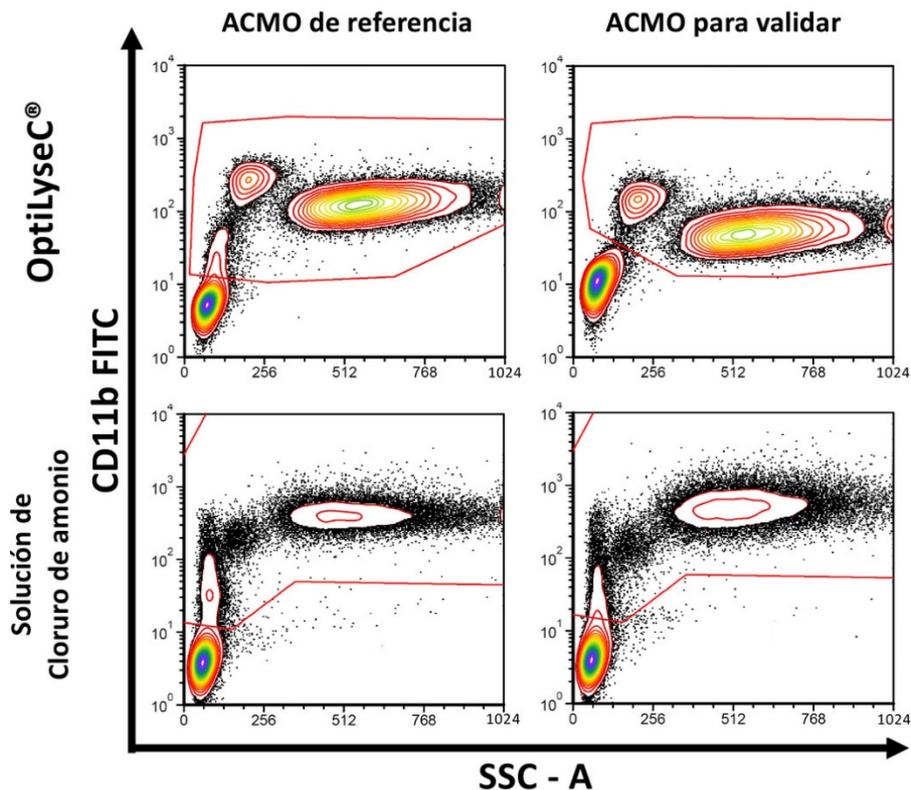


Figura 60. Pruebas para la validación del anticuerpo CD11b FITC. Los anticuerpos obtenidos a partir del mismo clon que el anticuerpo para validar reconocer un epítipo sensible a la fijación con formaldehído, el cual forma parte del reactivo OptiLyse C®. En los 4 gráficos se representa en el eje X la SSC-A y, en el eje Y la intensidad de fluorescencia del marcador CD11b FITC. En la fila superior se observa que con el anticuerpo de referencia se reconoce una población que el anticuerpo para validar no permite detectar al procesar las muestras con la solución OptiLyse C® (Lisis sin lavado). En la fila inferior se puede observar que ambos anticuerpos reconocen las mismas poblaciones al procesar la muestra con una solución de cloruro de amonio (Lisis y lavado).

En el testeo del marcador CD23 PE-DyLight594 se realizó una muestra adicional debido al bajo porcentaje de células objetivo en una de las muestras, concluyendo que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

En el testeo del marcador CD56 PE-DyLight594 se incluyó el bloqueo de uniones inespecíficas con FBS (*Fetal Bovine Serum*) después de las cinco primeras muestras. Una de las muestras adicionales presentó dificultades para la selección de la población objetivo entre el anticuerpo de referencia y el anticuerpo para validar, posiblemente debido a las diferencias entre el clon y fluorocromo de ambos anticuerpos. Por lo tanto,

se adquirieron tres muestras adicionales y se concluyó que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

En el testeo del marcador CD117 FITC, se adquirieron quince muestras debido a que seis de ellas presentaron una débil densidad del antígeno, lo que dificultó la separación de la población positiva y negativa y, otra de las muestras se adquirió con un voltaje diferente en el canal en el que se detectaba el anticuerpo de referencia y el anticuerpo para validar, por lo que fueron descartadas. Finalmente, se concluyó que el rendimiento del anticuerpo es aceptable.

| No. | Anticuerpo         | $\Delta\%$ células objetivo (%) |           |           |           |           | Criterios de aceptación                                     |                    |
|-----|--------------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|--------------------|
|     |                    | Muestra 1                       | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | $\Delta\%$ células objetivo<br>[ $\geq -5\%$ , $\leq 5\%$ ] | Conformidad de uso |
| 1   | CD10 AF700         | +1,79                           | -0,74     | +0,68     | -0,47     | -0,18     | Apto  | Apto               |
| 2   | CD11b AF700        | +1,10                           | +0,79     | +0,46     | +1,17     | -1,36     | Apto  | Apto               |
| 3   | CD11b FITC         | +4,97                           | -0,57     | -1,03     | -0,70     | -4,99     | Apto  | Apto               |
| 4   | CD11b PE-Cy7       | -0,64                           | +0,12     | -0,69     | -0,41     | -2,81     | Apto  | Apto               |
| 5   | CD19 PE-DyLight594 | -0,01                           | -0,07     | +0,02     | +0,98     | +0,39     | Apto  | Apto               |
| 6   | CD23 PE-DyLight594 | +1,02                           | -0,06     | +0,88     | -1,94     | +0,52     | Apto  | Apto               |
| 7   | CD34 PE-DyLight594 | -0,42                           | -0,02     | -0,02     | +0,01     | -0,04     | Apto  | Apto               |
| 8   | CD38 APC-Cy7       | -0,80                           | -4,19     | -0,67     | -1,13     | +2,40     | Apto  | Apto               |
| 9   | CD56 PE-DyLight594 | -3,75                           | -2,95     | -3,57     | -2,79     | -0,83     | Apto  | Apto               |
| 10  | CD117 AF700        | +0,79                           | -2,43     | -3,14     | +4,84     | -2,65     | Apto  | Apto               |
| 11  | CD117 APC-Cy7      | -0,33                           | +2,42     | +3,29     | +0,26     | +2,00     | Apto  | Apto               |
| 12  | CD117 FITC         | -0,11                           | -0,46     | -3,88     | +1,08     | +0,02     | Apto  | Apto               |
| 13  | CD123 FITC         | +0,05                           | -0,02     | +2,15     | +0,92     | -1,90     | Apto  | Apto               |

**Tabla 10. Resumen de las  $\Delta\%$ co obtenidas con los anticuerpos para validar y sus respectivos anticuerpos de referencia, para las muestras probadas con los 13 anticuerpos de la Fase VIII.**

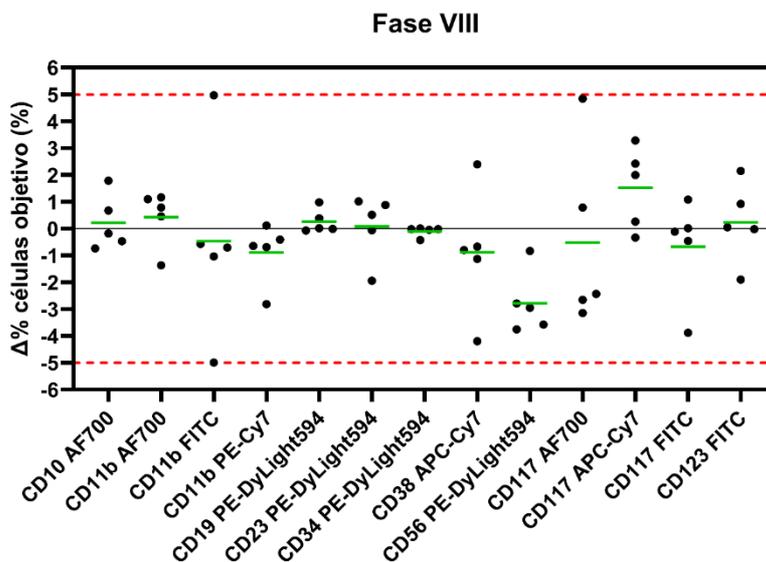


Figura 61. Representación gráfica de las  $\Delta\%co$  obtenidas entre el anticuerpo para validar y el anticuerpo de referencia para las 5 muestras probadas con los 18 anticuerpos de la Fase VIII. Las líneas punteadas rojas indican el umbral del criterio de aceptación de  $\pm 5\%$  de  $\Delta\%co$ . Las líneas verdes representan el promedio de la  $\Delta\%co$  de las 5 muestras válidas analizadas para cada anticuerpo.

## 2.8 Compendio Fases I a VIII

Cabe destacar que el 95,5% de las muestras válidas y que superaron los criterios de aceptación mostraron una diferencia inferior al 2,5% respecto el anticuerpo de referencia, muy por debajo del 5% estipulado en el estudio.

Al analizar en conjunto los resultados obtenidos por todas las pruebas válidas del estudio, se observó que la diferencia absoluta entre los anticuerpos a evaluar y sus respectivos anticuerpos de referencia, en el porcentaje de células objetivo, era menor cuando las células objetivo representaban un porcentaje inferior al 20-30% (**Figura 62**). Esto resulta especialmente importante para demostrar el valor de los anticuerpos validados para identificar poblaciones celulares con baja concentración, siendo estas poblaciones aquellas en las que un error o desviación tiene un efecto mayor debido a la baja proporción celular.

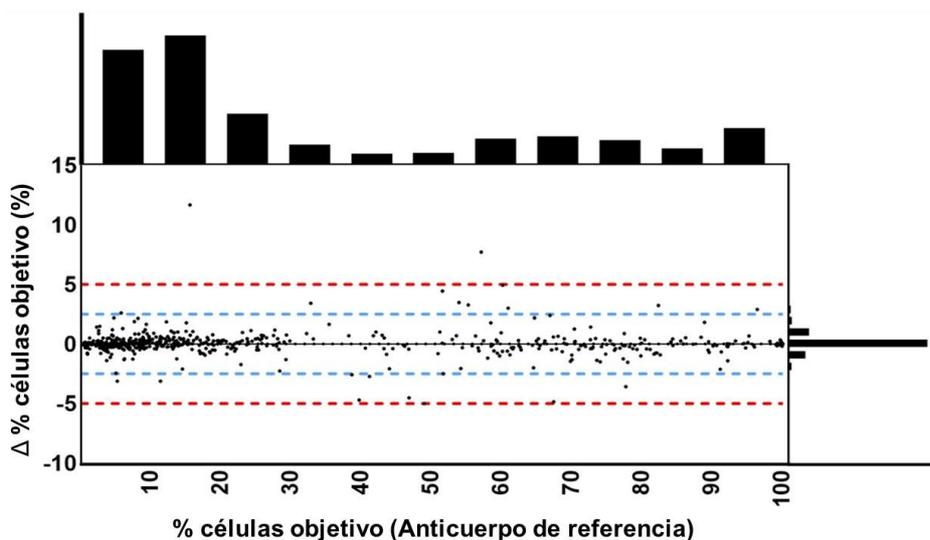


Figura 62. Distribución de la  $\Delta\%co$  entre el anticuerpo de referencia y al anticuerpo para validar (eje Y), sobre el porcentaje de células objetivo del anticuerpo de referencia (eje X). Las líneas discontinuas en rojo muestran el 5% de  $\Delta\%co$  que supone el límite para la validación según los criterios de aceptación estipulados. Las líneas discontinuas en azul muestran el 2,5% de  $\Delta\%co$ . Se puede observar que el 95,5% de las muestras no superan el 2,5% de  $\Delta\%cd$ , así como una menor dispersión de la  $\Delta\%cd$  en los porcentajes inferiores al 30%.

Siendo las dos únicas muestras con una diferencia superior al 5%, pertenecientes a las pruebas de anticuerpo CD117 PE-Cy7 (11,68% y 7,72%), y como se explica en el apartado “2.4 Fase V” de los resultados, estas diferencias se debieron a que este anticuerpo presentó una mayor resolución para discriminar las células positivas de las negativas, respecto el anticuerpo de referencia. Exceptuando estas dos muestras por los motivos expuestos, destaca una menor dispersión de la  $\Delta\%co$  en las muestras con una población de células objetivo inferior al 30%.



## DISCUSIÓN



El objetivo principal que se ha planteado en esta Tesis Doctoral es demostrar la importancia, relevancia y viabilidad de la transferencia de metodologías de citometría de flujo del laboratorio a la práctica clínica, con la intención de generar un beneficio para el paciente a nivel individual y comunitario.

Para ello se han llevado a cabo cuatro estudios en los que se explora el potencial de la citometría de flujo de abarcar múltiples niveles de transferencia para permitir implementar mejoras en la práctica clínica. Esto se ha realizado principalmente a través de las metodologías de mínima manipulación posible de la muestra, resultando fundamental para estudiar las células en su estado nativo y permitiendo combinar ensayos de inmunofenotipo y funcionales en células vivas.

Partiendo de la base de que la citometría de flujo es una tecnología que permite realizar análisis celulares de alto rendimiento y a nivel de célula única, resulta fundamental que la información corresponda a una única célula, y, por lo tanto, tener en cuenta el fenómeno de la coincidencia. Por ello, los citómetros cuentan con sistemas de eliminación de eventos electrónicos coincidentes (**Figura 30 A, B**). Además de contar con estos sistemas, para minimizar la coincidencia en un experimento, se debe planificar una tasa de eventos muy por debajo de la tasa de coincidencia del 10% teniendo en cuenta que los eventos coincidentes aleatorios sigan la distribución de Poisson para ajustar las células analizadas al *dead time* del citómetro de flujo<sup>18,19,131</sup>.

Además de la eliminación de los eventos electrónicos coincidentes y la planificación del ensayo, también se aplica la discriminación de los agregados en el análisis. Por una parte, el método más habitual para realizar dicha discriminación en los estudios de inmunofenotipo se basa en la comparación de los parámetros del pulso de la dispersión de la luz<sup>23</sup> (**Figura 20**). Sin embargo, en muestras con una elevada concentración o tasa de eventos, debido a que la dispersión de la luz de los eritrocitos causa coincidencia con los leucocitos (**Figura 24 C**), generalmente se realiza la lisis de los eritrocitos sin recurrir a diluciones 1:500 de la muestra<sup>100</sup>. Por otra parte, está descrito el uso de la fluorescencia para la discriminación de los dobletes (**Figura 21**) en estudios de ciclo celular y ploidía<sup>23</sup>.

De hecho, los métodos de mínima manipulación de la muestra discriminan los eritrocitos de los leucocitos utilizando marcadores fluorescentes, mediante la configuración del umbral de fluorescencia o explorando las diferencias en la dispersión de la luz entre estos, debido a la diferencia de absorbancia de la oxihemoglobina a 488 nm y 405 nm<sup>23,100,101</sup>. Se debe tener en cuenta que los eritrocitos, a pesar de ser discriminados en la adquisición, siguen presentes en la muestra, por lo que es recomendable utilizar el parámetro altura del pulso al utilizar los métodos de mínima manipulación de la muestra, debido a que los eritrocitos contribuyen al parámetro área del pulso de los leucocitos (**Figura 25**).

El método de discriminación de dobletes mediante marcadores fluorescentes del ADN, permite también discriminar los eritrocitos y los dobletes con una preservación óptima del pulso de fluorescencia<sup>240</sup>. Este método resulta compatible con las condiciones de lisis y lisis con lavado de la muestra (**Figura 24, 26 y 27**), en el caso de que fuese necesario por los requerimientos del estudio, así como también es compatible entre diferentes modelos de citómetros (**Figura 31**).

Cabe destacar que, aunque el método de dispersión de la luz y el de fluorescencia permitan discriminar los dobletes de forma comparable bajo las condiciones de lisis y lisis con lavado, el método de fluorescencia resuelve mejor las poblaciones de singletes (**Figura 24**). Además, también permite discriminar los dobletes en muestras con una elevada celularidad y agregados, sin necesidad de diluir la muestra (**Figura 28**) e independientemente de las características de dispersión de la luz de las células (**Figura 29**), resultando de especial importancia para facilitar los estudios de poblaciones minoritarias como, por ejemplo, la detección de la ERM. Cabe mencionar que es recomendable realizar la discriminación de dobletes sobre la población de interés, pues generalmente se reduce en gran medida el número de eventos facilitando la delimitación del *clúster* de singletes (**Figura 29 F**).

También se debe tener en cuenta que, aunque se reportan buenos resultados en estudios en los que se utilizan soluciones de lisis, estas pueden afectar a las mediciones sobre la dispersión de la luz. Esto se debe a múltiples factores, como el índice de refracción entre el medio externo e interno de la célula, la integridad de la membrana

plasmática, la estructura interna, la forma y orientación de la célula o la presencia de materiales que absorben la longitud de onda incidente<sup>100</sup>.

Así, por ejemplo, las soluciones de lisis basadas en cloruro de amonio o en formaldehído pueden causar la disminución de la dispersión frontal de la luz o afectar al reconocimiento del epítipo objetivo por el entrecruzamiento de proteínas<sup>241</sup>, entre otros efectos<sup>242-244</sup>. También pueden producir la lisis incompleta de los eritrocitos, especialmente en muestras patológicas, y la depleción de leucocitos<sup>245</sup>, con el considerable impacto en estudios de poblaciones minoritarias<sup>236</sup>. De hecho, en los resultados obtenidos en esta Tesis, se observó que el valor de la concentración celular obtenida mediante mínima manipulación de la muestra fue superior a la del valor obtenido mediante lisis y lavado (condición  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (**Figura 27 C**). También se obtuvo una pendiente inferior a 1 (pendiente = 0,92) en la recta de regresión al comparar el método de lisis con lavado y los métodos de mínima manipulación de la muestra, indicativo de una pérdida leucocitaria, como ha sido reportado en anteriores estudios<sup>154,246</sup>.

La relación entre los parámetros de dispersión de la luz entre las células simétricas y asimétricas tiende a ser diferente, este hecho puede dificultar la discriminación de los dobletes mediante la dispersión de la luz, por el contrario, el método basado en fluorescencia no se ve afectado por estas características<sup>131</sup>.

Otra posible aplicación reside en la aplicación de estudios de inmunofenotipo y funcionales en células proliferantes vivas. Esto se debe a los estudios descritos por Böhmer y colaboradores<sup>153</sup>. Por una parte, demostraron que la blastogénesis de las células T activadas por antígeno, causa un incremento en la amplitud de la FSC que permite discriminar y cuantificar las células proliferantes sin utilizar marcadores adicionales. Por otra parte, que las células T proliferantes pueden ocupar la misma región que los dobletes y por tanto serían excluidas como tales siguiendo el método basado en la dispersión de la luz (**Figura 23**). El método presentado en esta Tesis resulta compatible con el presentado por Böhmer y colaboradores, permitiendo discriminar los dobletes a la vez que identificar las células proliferantes y combinarlo con ensayos de inmunofenotipo y funcionales.

Esta combinación de ensayos de inmunofenotipo y funcionales es necesaria para llevar a cabo el siguiente nivel de transferencia. En este estudio, la técnica adaptada es la prueba citoquímica de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina granulocitaria, la cual es el método de evaluación más utilizado en la práctica clínica habitual como parte de las pruebas necesarias en casos de enfermedades hematológicas, tanto en el soporte al diagnóstico como en el seguimiento de estas<sup>114</sup>. Prueba de su robustez, es el hecho de que desde que la técnica fue descrita por Kaplow en 1955<sup>166</sup>, han sido pocas las modificaciones que se han introducido, limitadas a los reactivos utilizados y la clasificación de la actividad del enzima.

En este caso, la utilización de la citometría de flujo permite una mayor sensibilidad debido a la detección de la fluorescencia, y obtener valores representativos de la actividad del enzima en una escala de intensidades muy superiores a la clasificación que se puede obtener por microscopía óptica. Asimismo, permite realizar el análisis en condiciones más sensibles a las clasificaciones dependiente de observador de hasta 6 niveles de intensidad<sup>173</sup>. Este hecho se demostró al comparar los valores de índices de actividad obtenidos de 29 muestras mediante ambos métodos. Además, se observó que los valores son diferentes en término de rango de actividad de la enzima y que la citometría de flujo aporta unos valores con una mayor variabilidad de la asignación de la intensidad de fluorescencia. También se observó que los valores obtenidos de ambos métodos normalizados reflejaban diferencias estadísticamente significativas (**Figura 36**), demostrando un incremento de la diferencia a medida que incrementaban dichos valores (**Figura 37**).

Cabe mencionar que a pesar de que el método citoquímico ha permanecido casi inalterable, otros autores han adaptado esta técnica a la citometría de flujo<sup>174-176</sup>. Estos estudios se basan en la detección de la expresión de la enzima mediante anticuerpos. Ambas aproximaciones requieren sin embargo la utilización de células fijadas.

En ausencia de un protocolo de consenso para la cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina granulocitaria mediante citometría de flujo, esta aproximación publicada en *Current Protocols In Cytometry*<sup>127</sup>, podría permitir nuevas investigaciones y aplicaciones clínicas.

En este ensayo, se utilizó el sustrato APLS, previamente aplicado a la citometría de flujo por el grupo de investigación del director de esta Tesis<sup>62,94</sup>. El desarrollo de nuevos reactivos y sustratos permeables y fluorogénicos, favorecen el avance y adopción de las metodologías de mínima manipulación de la muestra, así como ofrecer nuevas posibilidades para la identificación de poblaciones celulares funcionalmente, que de otro modo sería complejo identificar<sup>62</sup>.

El método semicuantitativo permite agrupar las células en función del grado de intensidad del color representativo de la actividad del enzima (**Figura 34**); mientras que en el método cuantitativo detecta la intensidad de la fluorescencia de manera proporcional a dicha actividad (**Figura 10**). Por lo tanto, para el método de citometría de flujo se aplicó una fórmula acorde a la estrategia seguida en el método citoquímico (**Figura 11**). Esta fórmula se ha basado en el índice de tinción y en la distribución de la intensidad de fluorescencia representativa de la actividad del enzima en décadas de fluorescencia, y adaptando al porcentaje respecto del total de las células en cada década de intensidad.

Para comparar ambos métodos, se desarrolló un sistema de análisis de imagen digital según la escala de grises, y así poder cuantificar la intensidad relativa a la actividad del enzima y compararla con el método de citometría de flujo.

Se escogió la escala de grises porque en el método citoquímico las células se clasifican y agrupan por la intensidad del color del precipitado, que resulta más oscuro a mayor actividad del enzima y, a la vez, simplifica el análisis al eliminar la variable de la tonalidad del color. De hecho, los valores de intensidad del color en escala de grises se corresponden con los grados de clasificación clínica del sistema citoquímico (**Figura 39**). A pesar de ello, el análisis en escala de grises se demostró insuficiente para realizar el análisis digital, debido a la saturación del color en los neutrófilos con una elevada actividad fosfatasa alcalina granulocitaria respecto al núcleo de la célula (**Figura 14**).

Por lo tanto, se desarrolló otro método de análisis según el modelo de color HSB, el cual se adapta mejor a los requisitos del análisis visual del método citoquímico, debido a que evalúa la gradación de los colores incluidos en el espectro de luz visible, la saturación del color y la intensidad del brillo.

La inclusión del espectro de luz visible entre las variables permite realizar un análisis que se aproxime a la percepción visual del observador, diferenciando los colores de la imagen y dificultando la superposición del color del citoplasma y precipitados respecto al núcleo de la célula. La saturación del color permite analizar la intensidad del color del citoplasma y el precipitado, y la intensidad del brillo resulta un factor determinante del ruido de fondo en el análisis digital, ya que se ve afectado directamente por la intensidad de la fuente de iluminación del microscopio, siendo fundamental para la normalización de los valores y poder realizar la comparación entre muestras (**Figura 41 y 42**). Por otro lado, también se desarrolló una fórmula para adaptar el análisis digital con las características del método citoquímico de forma similar a la desarrollada para el método de citometría de flujo (**Figura 16**). En este caso, el análisis HSB de n=199 imágenes de 3 muestras diferentes, también se correspondió con los grados de clasificación clínica del sistema citoquímico (**Figura 43**).

Una vez desarrollado el método para cuantificar la intensidad del color de las imágenes, se procedió a comparar los valores de la actividad fosfatasa alcalina según: 1) el método citoquímico y el análisis visual de las extensiones; 2) el método citoquímico y el análisis de imagen digital HSB sobre las imágenes de microscopía de las mismas extensiones; 3) el método de análisis digital HSB y 4) el método de citometría de flujo (**Figura 44**).

Al comparar el método citoquímico y el análisis de las imágenes se observaron diferencias, posiblemente debidas al recuento de diferentes granulocitos presentes en la extensión por observadores independientes (**Figura 43**). Las mayores diferencias se obtuvieron al comparar el método de citometría de flujo con el resto de los métodos, con unas diferencias en los valores de actividad fosfatasa alcalina de entre un 12% y 84%, e incluso al comparar el método de citometría de flujo con el análisis HSB, estas diferencias oscilan entre un 21% y 79%.

Estas diferencias posiblemente se deban a: (a) la mayor sensibilidad de la citometría de flujo, (b) el número de células analizadas entre los métodos comparados, (c) el método de mínima manipulación de la muestra, por lo que se están evaluando células vivas en su estado nativo y (d) que los granulocitos analizados por citometría de flujo son más representativos a los analizados mediante los otros métodos.

El método citoquímico está avalado por décadas de práctica clínica<sup>114</sup>, así como el uso clínico de la citometría de flujo<sup>94</sup>, y de APLS en cultivos celulares<sup>61</sup> y en citometría de flujo<sup>62</sup>. La explicación más plausible a las diferencias en los valores obtenidos mediante el método de citometría de flujo y el método citoquímico, reside en la evaluación de diferentes actividades de la misma enzima o familia de enzimas TSNP, puesto que el sustrato utilizado en el método citoquímico solo es procesado por la fosfatasa alcalina granulocitaria, mientras que APLS es procesado por otras poblaciones leucocitarias. Este fenómeno se puede observar en el panel de adquisición de citometría de flujo, al enfrentar la intensidad de la fluorescencia del APLS-H con la SSC-H (**Figura 8 D**).

Otro nivel de traslación tratado en esta Tesis es la implementación de tecnologías disponibles para el recuento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+.

El trasplante hematopoyético es un procedimiento potencialmente curativo en diversas enfermedades hematológicas<sup>188</sup>. Para intentar asegurar el éxito del injerto, es necesario infundir un número mínimo de células CD34+. Por ello, es necesario monitorizar su recuento mediante citometría de flujo.

Aunque existen diversos métodos contrastados, el recuento más utilizado según UK-NEQAS<sup>213</sup> es el descrito en las recomendaciones de la ISHAGE<sup>42</sup>. Por lo tanto, este estudio se realizó basándose en estas recomendaciones (**Figura 17**). Se debe tener en cuenta que, para poder realizar las comparaciones, se utilizaron los sistemas volumétricos reales además de microesferas y el láser verde-amarillo para la excitación de la ficoeritrina (PE) conjugada al anticuerpo CD34. El uso del láser verde-amarillo se debe a las ventajas demostradas por el grupo en un trabajo previo<sup>59</sup>, con mejor resolución de la población CD34+, a la vez que se minimizan y/o eliminan fuentes de variabilidad al no requerir la compensación de la fluorescencia con la del anticuerpo CD45 conjugado con FITC<sup>59</sup>.

Pese a que otros autores han demostrado la utilidad de los sistemas volumétricos reales para realizar el recuento de las células CD34+, estos estudios no han seguido exactamente las recomendaciones de la ISHAGE<sup>247</sup>, o no se reportó el fenómeno de la desaparición de las microesferas<sup>248</sup> debido a que añadieron albúmina en la preparación de las muestras<sup>51</sup>, como recomendó Brando y colaboradores<sup>214</sup>, y utilizaron una

cantidad de microesferas inferior a la recomendada por el fabricante. De esta manera, tampoco se pudo verificar el beneficio del sistema volumétrico real sobre este fenómeno de desaparición de las microesferas.

En otro estudio, en cambio, sí reportaron diferencias entre los valores obtenidos con el sistema basado en microesferas y el sistema volumétrico real<sup>53</sup>, concluyendo que parte de las diferencias eran debidas al propio equipo, como: ajustes del sistema volumétrico del aparato, los sensores eléctricos y el diámetro interno de los tubos de las muestras, debido a las características del sistema volumétrico TVAC (*True Volumetric Absolute Counting*)<sup>53</sup> equipado en el citómetro de flujo que utilizaron en dicho estudio.

Estos estudios previos, realizaron diversas valoraciones sobre el recuento con sistemas volumétricos reales, sin embargo, en el estudio desarrollado en esta Tesis, se llevó a cabo como se indicó previamente, siguiendo el modelo de las recomendaciones de la ISHAGE, con un total de 55 muestras humanas, procesadas íntegramente por el personal del Servicio de Hematología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Se compararon los valores de recuentos de células CD34+ obtenidas en el citómetro Cytomics FC500™ mediante el sistema volumétrico de microesferas con los valores obtenidos en el citómetro Attune™ NxT, mediante el sistema volumétrico real e incluyendo el láser verde-amarillo. Adicionalmente también se compararon los valores obtenidos entre ambos sistemas de recuento en el citómetro de flujo Attune™ NxT.

Los resultados obtenidos demostraron que ambos métodos eran precisos, aunque los recuentos obtenidos con el sistema de microesferas, tanto en el Cytomics FC500™ como en el Attune™ NxT, mostraron unos recuentos mayores a medida que se incrementaba la concentración de células CD34+ (**Figuras 44 a 47**). Estos resultados reflejan el fenómeno descrito de la desaparición de las microesferas<sup>214</sup>, de manera que a medida que disminuye la concentración de microesferas adquiridas, el cálculo realizado para obtener el recuento de células CD34+ reporta unos valores superiores a los reales.

Adicionalmente se compararon los resultados obtenidos con el sistema de microesferas en el Cytomics FC500™ y el Attune™ NxT (**Figuras 48 y 49**). Estos mostraron una fuerte correlación y, a su vez, no se observó un incremento en el recuento a medida que aumentaba la concentración de células CD34+.

Al analizar valores inferiores a 20 células CD34+ (**Figura 51**), debido a que el punto de corte para iniciar la leucoaféresis se encuentra entre las 10 y 20 células CD34+/ $\mu\text{L}$ <sup>205</sup>, se observó que las diferencias entre los valores incrementaron visiblemente en valores inferiores a 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$ . De hecho, según el recuento realizado con microesferas, cuatro de las muestras analizadas superaban el umbral de 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$ , sin embargo, no lo alcanzaban según el sistema volumétrico real. Cabe destacar que las diferencias de estas cuatro muestras entre ambos sistemas de cuantificación mostraron un incremento de entre un 18% y un 36% al utilizar el sistema de microesferas. Asimismo, al comparar los resultados de las 55 muestras, el incremento medio fue de un 21%.

Los resultados obtenidos mediante el sistema de microesferas, en aquellas muestras cuyos recuentos de células CD34+ no superen en un 21% el umbral de 10 células CD34+/ $\mu\text{L}$ , podrían repercutir negativamente en el proceso de la leucoaféresis y el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Y, los resultados en sistemas volumétricos reales, muestran que son una alternativa prometedora para el recuento de células CD34+, resultando en un sistema de recuento intercambiable con el descrito en las recomendaciones internacionales establecidas por la ISHAGE<sup>42</sup>.

A favor de dichos sistemas volumétricos reales también se debe valorar que, como se indica en las propias recomendaciones de la ISHAGE, para lograr una mayor concordancia en las comparaciones inter e intralaboratorio, es necesaria una reducción de las variables de la prueba. Este objetivo se cumple con el sistema volumétrico real al eludir el fenómeno de la desaparición de las microesferas y proporcionando de forma directa y en tiempo real la concentración celular de la población de interés. Además, dicho sistema mantiene la sensibilidad, precisión y velocidad de la prueba, pues es un método reproducible con diferentes citómetros de flujo, como se ha comprobado en un elevado número de muestras valoradas.

Resultó beneficiosa la aplicación del láser verde-amarillo ya que evita la compensación de las fluorescencias entre el FITC y el PE, elude la posible variabilidad asociada y, además incrementa el valor del índice de tinción facilitando la resolución de la población CD34+.

Una opción interesante tras los resultados obtenidos es la aplicación del sistema de discriminación de dobletes mediante los métodos de mínima manipulación de la muestra en el recuento de células CD34+. Esto permitiría incluir ensayos funcionales, como por ejemplo, el de la fosfatasa alcalina, y valorar su implicación clínica en este tipo de muestras, ya que se ha demostrado que el incremento de su nivel de actividad en células blásticas de pacientes con leucemia mieloide aguda, puede estar asociado a un mayor riesgo de recaída, resistencia al tratamiento y mortalidad<sup>94</sup>.

El siguiente nivel de transferencia, trata de la validación clínica de una larga serie de anticuerpos monoclonales para otorgarles la acreditación CE-IVD. Esta validación es un paso necesario para que los profesionales dispongan de más herramientas, que permitan ayudarles y mejorar el diagnóstico, clasificación y seguimiento de hemopatías, leucemias y linfomas.

Para poder validar clínicamente los anticuerpos monoclonales y otorgarles el marcado CE-IVD, es necesario verificar en muestras patológicas si cada reactivo es capaz de reconocer de forma reproducible el antígeno diana, para el cual han sido desarrollados.

Para seleccionar las muestras, se debe diferenciar entre los marcadores de poblaciones comunes y de poblaciones minoritarias que requieran ser testadas. En este segundo caso, es necesario conocer en qué patologías se expresa el marcador y en qué condiciones, especialmente en los casos de marcadores de poblaciones minoritarias asociados a ciertas patologías. Ejemplos de estos casos son los marcadores CD1a, CD103, CD117, CD123, los cuales se pueden encontrar sobreexpresados o, en proporciones minoritarias, en muestras no patológicas. Para este estudio se dispuso del citómetro de flujo Navios™ EX con marcado CE-IVD.

La selección del clon del que se obtiene el anticuerpo, es un factor muy importante para tener en cuenta, debido a que para un mismo marcador existen diferentes clones, mientras que diferentes clones pueden generar anticuerpos que presenten diferente especificidad sobre el epítipo objetivo del marcador<sup>228</sup>. Por ejemplo, en el caso del marcador CD123, descrito en células dendríticas y células blásticas de leucemias agudas, existen clones que permiten detectarlo en células dendríticas pero muestran una baja especificidad en las células blásticas en leucemias agudas<sup>228</sup>.

En cuanto al procesamiento y adquisición de las muestras, se realizaron modificaciones sobre el diseño experimental original, los cuales fueron comunicados y consensuados con los responsables del proyecto por parte de la empresa biotecnológica; que se incluyeron en sus respectivas IFU (*Instructions For Use*).

Algunos de estos cambios en el diseño experimental fueron:

- Que el diseño experimental original incluía la lisis y el lavado de las muestras, siendo este último el causante de una mayor pérdida celular respecto a la lisis sin lavado, como se observó en el estudio sobre los métodos de discriminación de dobletes (**Figura 32**). Por lo tanto, se utilizó la solución IVD de lisis sin lavado basada en formaldehído, OptiLyse C®.
- En el caso del anticuerpo CD11b FITC, Origene<sup>249</sup> y BioRad<sup>250</sup> reportaron que el epítipo reconocido por el clon de dicho anticuerpo es sensible a la fijación por formaldehído. Por ello, se optó por realizar el procedimiento de lisis y lavado de la muestra utilizando una solución de cloruro de amonio (**Figura 60**).
- Que la validación se tenía que realizar únicamente con muestras de sangre periférica, debido a que los marcadores de determinados anticuerpos se encuentran expresados en muestras de médula ósea, se aprobó su uso en estos casos.
- El marcador panleucocitario CD45, se estableció como marcador de referencia a partir del cual comparar las poblaciones de interés. En el caso de los anticuerpos anti-cadenas Kappa y Lambda, se añadió un segundo marcador de referencia, el CD19 o CD20, para la identificación de los linfocitos B sobre el resto de los leucocitos. En el caso de los marcadores de plaquetas CD41 y CD61 se descartó el uso del marcador CD45, y se configuró el umbral de detección según la dispersión lateral de la luz. Esta configuración permite obtener una mejor resolución de partículas más pequeñas y por lo tanto, detectar las plaquetas según sus propiedades de dispersión de la luz, las cuales presentan un tamaño de 3 a 5 veces inferior a los leucocitos<sup>251</sup> (**Figura 18**).
- El protocolo original se modificó para llevar a cabo la validación de marcadores intracelulares como el CD79a y mieloperoxidasa, siguiendo las IFU del fabricante de los anticuerpos competidores.

Por otro lado, destacan las modificaciones realizadas en el análisis de datos, siendo posiblemente el factor más crítico en la validación de los anticuerpos, debido a la variabilidad asociada<sup>74,235,252</sup>, que cobra mayor relevancia en los estudios de marcadores de poblaciones minoritarias, tumorales y muestras patológicas con expresión aberrante de antígenos. Concretamente, en la validación del marcador CD34, se modificó el protocolo de análisis utilizado en la mayoría de los anticuerpos validados y, se adaptó al protocolo de análisis recomendado por la ISHAGE (**Figura 19**). Se puede dar que el anticuerpo a validar no cumpla alguno de los requisitos para su marcaje CE-IVD y este lo obtenga, como fue en el caso del anticuerpo CD117 PE-Cy7 testado en la Fase V (**Figura 56**). En este caso, mostró una diferencia superior al 5% respecto a la población diana obtenida con el anticuerpo de referencia, por encima de los criterios de aceptación. Esta diferencia se debió a que este anticuerpo presentó una mejor resolución para discriminar las células positivas de las negativas, respecto al anticuerpo de referencia, por lo tanto, fue considerado como apto y se le otorgó el marcado CE-IVD.

Otros factores a tener en cuenta son, por ejemplo, el nivel de expresión que presenta el marcador en la población diana y la eficiencia cuántica del fluorocromo utilizado. Esto puede ser relevante para la identificación de poblaciones positivas que presentan una baja intensidad de fluorescencia o una baja relación *signal-to-noise*. La aplicación de ventanas de análisis booleano para comparar la población de interés con poblaciones negativas, facilitando su identificación. Así como, la compensación electrónica de los espectros de emisión y la posibilidad de utilizar la transformación biexponencial en los ejes, cuando se analizan muestras en las que la población de interés presenta una baja intensidad de la fluorescencia del marcador, para obtener una representación visual más precisa de dichas poblaciones.

Fruto de este estudio, se ha otorgado el marcado CE-IVD a 134 anticuerpos monoclonales. Destacando el rigor en la preselección de los anticuerpos RUO, así como la exhaustividad del procedimiento de validación, que se observa con el coeficiente de variación obtenido entre los anticuerpos para validar y los de referencia (**Figura 62**).

Tras los resultados obtenidos en los cuatro estudios realizados, se ha demostrado el potencial de la transferencia de la citometría de flujo a diferentes niveles:

En un primer nivel, se aplicaron los métodos de mínima manipulación de la muestra, discriminando los dobletes mediante fluorescencia y evitando posibles artefactos debido a las características de las propias células y a la manipulación de los diferentes especímenes, a la vez que se preserva la funcionalidad celular.

En este segundo nivel de transferencia, se ha demostrado cómo mediante el potencial de los métodos de mínima manipulación de la muestra aplicados en citometría de flujo en combinación con sustratos y marcadores fluorogénicos, permite adaptar otras técnicas y desarrollar nuevas aproximaciones para identificar poblaciones según su fenotipo y función, así como poder ofrecer nuevas oportunidades diagnósticas (**Figura 36 y 37**).

En el tercer nivel de transferencia se demuestra que la cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+ mediante sistemas volumétricos reales es comparable con las mediciones obtenidas con el sistema descrito en las recomendaciones internacionales de la ISHAGE basado en microesferas (**Figura 44 a 49**), con la ventaja de evitar errores de cálculo causados por el fenómeno de la desaparición de las microesferas.

Y el cuarto nivel, demuestra la sinergia entre la investigación básica y la traslacional, para llevar a cabo la validación de anticuerpos monoclonales para su uso en IVD, apoyando el diagnóstico, clasificación y seguimiento de hemopatías, leucemias y linfomas.

Respecto a los modelos de transferencia actuales, estos tienen mayormente en cuenta la retroalimentación entre el laboratorio, la clínica y la industria, y están enfocados en la aplicación de los descubrimientos generados durante la investigación en el laboratorio y los estudios preclínicos en el desarrollo de ensayos y estudios en humanos, tal y como define el NIH. Posiblemente, el mejor ejemplo es el modelo planteado en el NCATS, y con el que esta Tesis comparte ciertas similitudes, pues ambos constan de diversos pilares interconectados entre ellos y a la vez, centrados en el paciente<sup>105,106</sup>.

La colaboración establecida con la industria biotecnológica en los estudios realizados también ha resultado de gran importancia, siendo más directamente aplicable el estudio para la validación y marcado CE-IVD de anticuerpos monoclonales. Estas colaboraciones

son muy beneficiosas para la investigación, porque permiten desarrollar proyectos asociados a un nivel de incertidumbre muy elevado.

Tras el desarrollo y demostración de la utilidad de las mejoras metodológicas introducidas en estos estudios, es extraordinariamente importante la difusión de estos conocimientos, pudiendo considerarse como otro factor relevante o pilar en la investigación traslacional. En este aspecto, las vías de divulgación científica utilizadas contemplan la publicación de artículos científicos, presentaciones en congresos u otros eventos científicos, además de la difusión en redes sociales. En el caso de la presente Tesis Doctoral se publicó el segundo estudio aquí presentado, en *Current Protocols in Cytometry*<sup>127</sup>. A su vez, el primer y tercer estudio se encuentran en proceso de redacción para su publicación.

Otra vía de difusión de estos estudios puede realizarse a través de procedimientos de marketing, siendo la propia empresa quien difunde la información de manera acorde a sus planes estratégicos.

En esta Tesis se ha contribuido a confirmar que la citometría de flujo sigue presentando un gran potencial de desarrollo de metodologías citómicas avanzadas aplicadas al diagnóstico de hemopatías. Asimismo, se ha contribuido a demostrarla necesidad, relevancia y viabilidad de dicha transferencia mediante métodos de mínima manipulación posible de la muestra.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

En la presente Tesis se ha aplicado la citometría de flujo como herramienta para la transferencia del laboratorio a la clínica, utilizando métodos que permiten la mínima manipulación posible de las muestras biológicas, siendo posible reducir el impacto sobre posibles alteraciones celulares de naturaleza fenotípica y funcional. Este hecho permite alcanzar diferentes niveles de transferencia aplicables y adaptables a metodologías ampliamente establecidas internacionalmente.

En consonancia con los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis:

Del **primer estudio** se concluye lo siguiente:

- Los métodos de mínima manipulación de la muestra evitan, gracias a la discriminación de dobletes mediante fluorescencia, posibles artefactos relacionados con la identificación de células patológicas, especialmente en productos celulares altamente concentrados, o bien debido a la presencia de células anormalmente grandes.
- La mínima alteración posible de la muestra resulta especialmente importante para los estudios de poblaciones minoritarias, como en el caso de la detección de células madre tumorales y de la enfermedad residual medible, dado que la significativa reducción del proceso de manipulación de la muestra reduce las pérdidas celulares, así como potenciales artefactos en su detección, preservando a su vez la funcionalidad celular.

Del **segundo estudio** se concluye lo siguiente:

- Los métodos de mínima manipulación de la muestra pueden ser aplicables y escalables a procedimientos ampliamente establecidos, aumentando el tamaño muestral, incrementar la sensibilidad de la detección sobre la célula viva, y reducir la subjetividad en el análisis.
- El desarrollo de nuevos sustratos y marcadores fluorogénicos deberá permitir en combinación con los métodos de mínima manipulación de la muestra, nuevas aproximaciones para identificar subpoblaciones celulares, gracias la combinación del inmunofenotipo y la función celular.

## CONCLUSIONES

- La citometría de flujo funcional en combinación con los métodos de mínima manipulación de la muestra deberá ofrecer nuevas oportunidades diagnósticas.

Del **tercer estudio** se concluye lo siguiente:

- Los sistemas volumétricos reales permiten la cuantificación de progenitores hematopoyéticos CD34+ de manera comparable a los métodos recomendados por la ISHAGE, basados en la utilización de microesferas para el recuento absoluto, con la ventaja de evitar errores de cálculo debidos al fenómeno de la desaparición de las mismas.
- La aplicación de los sistemas volumétricos reales, no suponen una modificación del procedimiento descrito por la ISHAGE, sino una implementación para complementar ambas mediciones, por lo que deberían ser consideradas e incluidas en futuras revisiones de estas recomendaciones.

Del **cuarto estudio** se concluye lo siguiente:

- La coordinación entre los procesos de producción de anticuerpos y los procedimientos de validación han sido fundamentales para otorgar la acreditación CE-IVD, demostrando la sinergia entre la investigación básica y la traslacional.
- El elevado porcentaje de los anticuerpos validados demuestra el rigor en la selección de la versión RUO de estos mismos, mientras que el coeficiente de variación de las medidas realizadas para la validación de estos reactivos pone de manifiesto la exhaustividad del estudio realizado.
- El hecho de la existencia de potenciales discrepancias demostrada por la reactividad de determinados anticuerpos RUO cuando son confrontados con muestras de origen patológico, ha obligado a modificar el procedimiento originalmente establecido y adaptarlo de manera consensuada a los requisitos necesarios para otorgar la acreditación CE-IVD.
- Interpretaciones demasiado estrictas o sesgadas durante los procedimientos de validación pueden resultar en acreditaciones CE-IVD no válidas, con el considerable impacto negativo que ello podría tener a nivel diagnóstico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zoellner JM, Porter KJ. Chapter 6 Translational Research Concepts and Methods in Dissemination and Implementation Research. In: *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease.* ; 2017:125-143.
2. Cookson R. Evidence-based policy making in health care: what it is and what it isn't. *J Health Serv Res Policy.* 2005;10(2):118-121.
3. Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ.* 1996;312(7023):71-72.
4. K.M. Venkat Narayan, Edward W. Gregg, Michael M. Engelgau, et al. Translation Research for Chronic Disease: The case of diabetes. *Diabetes Care.* 2000;23(12):1794-1798.
5. Westfall JM, Mold J, Fagnan L. Practice-Based Research - "Blue Highways" on the NIH Roadmap. *J Am Med Assoc.* 2007;297(4):403-406.
6. Wehling M. Translational medicine: Science or wishful thinking? *J Transl Med.* 2008;6:1-3.
7. Benedyk M, Berglund L, Facciotti M, Mobley W, Zucker D. Strategies for innovation and interdisciplinary translational research: research and career benefits and barriers. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* 2009;57(2):477-481.
8. Strand DL. Everyday characterizations of translational research: researchers' own use of terminology and models in medical research and practice. *Palgrave Commun.* 2020;6(1):110.
9. NIH grants. Available from: <https://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/rfa-rm-06-002.html>
10. RFA-RM-07-007: Institutional Clinical and Translational Science Award (U54). Available from: <https://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-RM-07-007.html>
11. Bhagwat N, Dulmage K, Pletcher CHJ, et al. An integrated flow cytometry-based platform for isolation and molecular characterization of circulating tumor single cells and clusters. *Sci Rep.* 2018;8(1):5035.
12. Biancotto A, Fuchs JC, Williams A, Dagur PK, McCoy JP. High dimensional flow cytometry

- for comprehensive leukocyte immunophenotyping (CLIP) in translational research. *J Immunol Methods*. 2011;363(2):245-261.
13. Doan M, Vorobjev I, Rees P, et al. Diagnostic Potential of Imaging Flow Cytometry. *Trends Biotechnol*. 2018;36(7):649-652.
  14. Hughes-Parry HE, Cross RS, Jenkins MR. The evolving protein engineering in the design of chimeric antigen receptor T cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1):1-15.
  15. Fleischer LC, Spencer HT, Raikar SS. Targeting T cell malignancies using CAR-based immunotherapy: Challenges and potential solutions. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1-21.
  16. Cherian S, Hedley BD, Keeney M. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(6):449-463.
  17. Flores-Montero J, Kalina T, Corral-Mateos A, et al. Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2019;475(May):112618.
  18. Overture. In: *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, Ltd; 2003:1-60.
  19. How Flow Cytometers Work. In: *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, Ltd; 2003:101-223.
  20. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*. 1953;171(4340):37-38.
  21. Telford WG. Chapter 15 - Lasers in Flow Cytometry. In: Darzynkiewicz Z, Holden E, Orfao A, Telford W, Wlodkowic D, eds. *Recent Advances in Cytometry, Part A*. Vol 102. Methods in Cell Biology. Academic Press; 2011:373-409.
  22. Shapiro HM, Telford WG. Lasers for Flow Cytometry: Current and Future Trends. *Curr Protoc Cytom*. 2018;83:1.9.1-1.9.21.
  23. Cossarizza A, Chang H-DD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019;49(10):1457-1973.
  24. McClish M, Farrell R, Vanderpuye K, Shah KS. A Reexamination of Deep Diffused Silicon Avalanche Photodiode Gain and Quantum Efficiency. *IEEE Trans Nucl Sci*. 2006;53(5):3049-3054.
  25. Su X, Rozmus W, Tsui YY. Wide-angle light-scattering differentiation of organelle-size

- particle distributions in whole cells. *Cytom Part A*. 2010;77A(6):580-584.
26. Laerum OD, Farsund T. Clinical application of flow cytometry: A review. *Cytometry*. 1981;2(1):1-13.
  27. Meyerson H. Flow Cytometry in Hematology. In: Lazarus HM, Schmaier AH, eds. *Concise Guide to Hematology*. Springer International Publishing; 2019:253-275.
  28. Cordier G. Flow cytometry for immunology. *Biol cell*. 1986;58(2):147-150.
  29. Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, et al. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1995;221:145-152.
  30. Giaretti W. Origins of ... flow cytometry and applications in oncology. *J Clin Pathol*. 1997;50(4):275-277.
  31. McSharry JJ. Uses of flow cytometry in virology. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(4):576-604.
  32. Boeck G. Current status of flow cytometry in cell and molecular biology. In: Vol 204. *International Review of Cytology*. Academic Press; 2001:239-298.
  33. Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):167-195.
  34. Bakke AC. Clinical applications of flow cytometry. *Lab Med*. 2000;31(2):97-102.
  35. Béné MC, Le Bris Y, Robillard N, Wuillème S, Fouassier M, Eveillard M. Flow cytometry in hematological nonmalignant disorders. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(1):5-16.
  36. Duan Z, Gui Y, Li C, et al. The immune dysfunction in ankylosing spondylitis patients. *Biosci Trends*. 2017;11(1):69-76.
  37. Buldini B, Maurer-Granofszky M, Varotto E, Dworzak MN. Flow-Cytometric Monitoring of Minimal Residual Disease in Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia: Recent Advances and Future Strategies. *Front Pediatr*. 2019;7:412.
  38. Clift IC. Diagnostic Flow Cytometry and the AIDS Pandemic. *Lab Med*. 2015;46(3):e59-64.
  39. Kumpel BM, Macdonald AP, Bishop DR, Yates AF, Lee E. Quantitation of fetomaternal haemorrhage and F cells in unusual maternal blood samples by flow cytometry using anti-D and anti-HbF. *Transfus Med*. 2013;23(3):175-186.
  40. Ulrich H, Tárnok A. Flow cytometry detection of circulating tumor cells: Achievements and limitations as prognostic parameters. *Cytom Part A*. 2014;85(3):201-202.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

41. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*. 1996;5(3):213-226.
42. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry*. 1998;34(2):61-70.
43. Griesinger F, Pirò-Noack M, Kaib N, et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol*. 1999;105(1):241-255.
44. Kundt, A., & Lehmann O. Longitudinal vibrations and acoustic figures in cylindrical columns of liquids. *Ann der Phys und Chemie*. 1874;(153):1-11.
45. Goddard G, Kaduchak G. Ultrasonic particle concentration in a line-driven cylindrical tube. *J Acoust Soc Am*. 2005;117(6):3440-3447.
46. Goddard G, Martin JC, Graves SW, Kaduchak G. Ultrasonic particle-concentration for sheathless focusing of particles for analysis in a flow cytometer. *Cytom Part A*. 2006;69(2):66-74.
47. Ward MD, Kaduchak G. Fundamentals of Acoustic Cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2018;84(1):e36.
48. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*. 2017;8(3).
49. Neppiras EA. Acoustic cavitation. *Phys Rep*. 1980;61(3):159-251.
50. Goddard GR, Sanders CK, Martin JC, Kaduchak G, Graves SW. Analytical performance of an ultrasonic particle focusing flow cytometer. *Anal Chem*. 2007;79(22):8740-8746.
51. Saraiva L, Wang L, Kammel M, et al. Comparison of Volumetric and Bead-Based Counting of CD34 Cells by Single-Platform Flow Cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(6):508-513.
52. Mercolino TJ, Connelly MC, Meyer EJ, et al. Immunologic differentiation of absolute lymphocyte count with an integrated flow cytometric system: a new concept for absolute T cell subset determinations. *Cytometry*. 1995;22(1):48-59.
53. Mortazavi S, Ardalan FA, Nodehi SRS, Karder FF, Miraliakbari N. True volumetric method

- for flow cytometric enumeration of CD34 + stem cells and its agreement with a standard bead-based single-platform protocol. *Cytotherapy*. 2012;14(5):621-629.
54. BD Flow Sensor Option. Available from: <https://wwwbdbiosciences.com/en-dk/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/facsverse/bd-flow-sensor-option-for-facsverse-flow-cytometer.651157>
  55. BD FACSVerse. Available from: <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facsverse>
  56. Dietz LJ, Dubrow RS, Manian BS, Sizto NL. Volumetric capillary cytometry: a new method for absolute cell enumeration. *Cytometry*. 1996;23(3):177-186.
  57. Gossez M, Malcus C, Demaret J, Frater J, Poitevin-Later F, Monneret G. Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2017;92(6):456-464.
  58. Steen HB. A sample injection device for flow cytometers. *Cytometry*. 2002;49(2):70-72.
  59. G. Rico L, Juncà J, Ward MD, Bradford J, Petriz J. Yellow–green laser-based flow cytometry for CD34+ progenitor cell counting. *Cytom Part A*. 2018;93(2):172-176.
  60. Vybrant™ DyeCycle™ violet. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V35003#/V35003>
  61. Singh U, Quintanilla RH, Grecian S, Gee KR, Rao MS, Lakshmiopathy U. Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem cell Rev reports*. 2012;8(3):1021-1029.
  62. Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford J, Petriz J. Is alkaline phosphatase the smoking gun for highly refractory primitive leukemic cells? *Oncotarget*. 2016;7(44):72057-72066.
  63. Lee JA, Spidlen J, Boyce K, et al. MIFlowCyt: The minimum information about a flow cytometry experiment. *Cytom Part A*. 2008;73(10):926-930.
  64. Mahnke Y, Chattopadhyay P, Roederer M. Publication of optimized multicolor immunofluorescence panels. *Cytom Part A*. 2010;77(9):814-818.
  65. Park LM, Lannigan J, Jaimes MC. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytom Part A*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

66. Del Zotto G, Preijers F, Tárnok A. Phenotype Reports: A new Manuscript Type. *Cytom Part A*. 2019;95(6):645-646.
67. Del Zotto G, Preijers F, Tárnok A. Phenotype reports: Sharing the knowledge. *Cytom Part A*.
68. Lacombe F, Dupont B, Lechevalier N, Vial JP, Béné MC. Innovation in Flow Cytometry Analysis: A New Paradigm Delineating Normal or Diseased Bone Marrow Subsets Through Machine Learning. *HemaSphere*. 2019;3(2):e173.
69. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep*. 2016;6(February):1-11.
70. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
71. Espasa A, Torrents S, Morales-Indiano C, et al. Diagnostic performance of the ClearLLab 10C B cell tube. *Cytom Part B - Clin Cytom*.
72. Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia*. 2013;27(1):142-149.
73. Van Dongen JJMM, Van Der Burg M, Kalina T, et al. EuroFlow-based flowcytometric diagnostic screening and classification of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1-21.
74. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):191-200.
75. Lacombe F, Bernal E, Bloxham D, et al. Harmonemia: a universal strategy for flow cytometry immunophenotyping-A European LeukemiaNet WP10 study. *Leukemia*. 2016;30(8):1769-1772.
76. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, et al. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res*. 2013;2(1):17.
77. O'Leary M, Krailo M, Anderson JR, Reaman GH. Progress in childhood cancer: 50 years of

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- research collaboration, a report from the Children's Oncology Group. *Semin Oncol.* 2008;35(5):484-493.
78. De Pasquale MD, D'Angelo P, Crocoli A, et al. Salvage treatment for children with relapsed/refractory germ cell tumors: The Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP) experience. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(3):e28125.
79. Chang JE, Medlin SC, Kahl BS, et al. Augmented and standard Berlin-Frankfurt-Munster chemotherapy for treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(12):2298-2307.
80. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2007;21(5):956-964.
81. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia.* 2016;30(4):929-936.
82. Van Dongen JJM, O'Gorman MRG, Orfao A. EuroFlow and its activities: Introduction to the special EuroFlow issue of The Journal of Immunological Methods. *J Immunol Methods.* 2019;475:112704.
83. Van Der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, et al. The EuroFlow PID orientation tube for flow cytometric diagnostic screening of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Front Immunol.* 2019;10(MAR).
84. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-1975.
85. Van Dongen JJMM, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia.* 2012;26(9):1899-1907.
86. Solly F, Angelot-Delette F, Ticchioni M, et al. Standardization of Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematological Malignancies: The FranceFlow Group Experience. *Cytom Part A.* 2019;95(9):1008-1018.
87. Schlickeiser S, Streitz M, Sawitzki B. Standardized Multi-Color Flow Cytometry and

- Computational Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol.* 2016;1371:225-238.
88. Agarwal M, Seth R, Chatterjee T. Recent Advances in Molecular Diagnosis and Prognosis of Childhood B Cell Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL). *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2021 Jan;37(1):10-20.
  89. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, et al. AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2018;94(1):82-93.
  90. Kulkarni RD, Mishra MN, Mohanraj J, et al. Development of a dry-reagent mix-based polymerase chain reaction as a novel tool for the identification of *Acinetobacter* species and its comparison with conventional polymerase chain reaction. *J Lab Physicians.* 2018;10(1):68-72.
  91. Bento L, Correia R, de Sousa F, et al. Performance of eight-color dry antibody reagent in the detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia samples. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2020 Nov;98(6):529-535.
  92. Hedley BD, Keeney M, Popma J, Chin-Yee I. Novel lymphocyte screening tube using dried monoclonal antibody reagents. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2015;88(6):361-370.
  93. Hedley BD, Cheng G, Keeney M, et al. A multicenter study evaluation of the ClearLLab 10C panels. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2021; 100: 225– 234.
  94. Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Petriz J. Flow cytometric significance of cellular alkaline phosphatase activity in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2019;10(65):6969-6980.
  95. Hallermann L, Thom R, Gerhartz H. Elektronische Differentialzählung von Granulocyten und Lymphocyten nach intravitaler Fluochromierung mit Acridinorange. In: Schlegel B, ed. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Innere Medizin.* J.F. Bergmann-Verlag; 1964:217-219.
  96. Pichler J, Printz D, Scharner D, Trbojevic D, Siekmann J, Fritsch G. Improved flow cytometric method to enumerate residual cells: Minimal linear detection limits for platelets, erythrocytes, and leukocytes. *Cytometry.* 2002;50(4):231-237.
  97. Alvarez-Larran A, Jover L, Marin P, Petriz J. A multicolor, no-lyse no-wash assay for the absolute counting of CD34+ cells by flow cytometry. *Cytometry.* 2002;50(5):249-253.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

98. Terstappen LW, Loken MR. Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry*. 1988;9(6):548-556.
99. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, et al. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*. 1994;17(1):59-65.
100. Petriz J, Bradford JA, Ward MD. No lyse no wash flow cytometry for maximizing minimal sample preparation. *Methods*. 2018;134-135:149-163.
101. Ost V, Neukammer J, Rinneberg H. Flow cytometric differentiation of erythrocytes and leukocytes in dilute whole blood by light scattering. *Cytometry*. 1998;32(3):191-197.
102. Chabner BA, Boral AL, Multani P. Translational research: walking the bridge between idea and cure--seventeenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res*. 1998;58(19):4211-4216.
103. Chan JYH, Chang AYW, Chan SHH. New insights on brain stem death: from bedside to bench. *Prog Neurobiol*. 2005;77(6):396-425.
104. Cohrs RJ, Martin T, Ghahramani P, Bidaut L, Higgins PJ, Shahzad A. Translational medicine definition by the European society for translational medicine. *New Horizons Transl Med*. 2015;2(3):86-88.
105. Kilbourne AM, Jones PL, Atkins D. Accelerating implementation of research in Learning Health Systems: Lessons learned from VA Health Services Research and NCATS Clinical Science Translation Award programs. *J Clin Transl Sci*. 2020;4(3):195-200.
106. ENCATS Translational Science Spectrum. Available from: <https://ncats.nih.gov/translation/spectrum>
107. Le TT, Cramer JP, Chen R, Mayhew S. Evolution of the COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(10):667-668.
108. COVID-19 vaccine tracker and landscape. Accessed on 29<sup>th</sup> September 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
109. Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl Med Commun*. 2019;4(1):18.
110. McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2018;2018(February):5.1.1-5.1.11.
111. Bidgood RE, Powell EA. Fluidics. *Endeavour*. 1968;27(101):91-96.
  112. Kudernatsch RF, Letsch A, Stachelscheid H, Volk H-D, Scheibenbogen C. Doublets pretending to be CD34+ T cells despite doublet exclusion. *Cytom Part A*. 2013;83A(2):173-176.
  113. Burel JG, Pomaznoy M, Lindestam Arlehamn CS, et al. The Challenge of Distinguishing Cell-Cell Complexes from Singlet Cells in Non-Imaging Flow Cytometry and Single-Cell Sorting. *Cytom Part A*. 2020 Nov;97(11):1127-1135.
  114. Woessner S, Florensa L. La Citología Óptica En El Diagnóstico Hematológico. 5th ed. Acción médica; 2006.
  115. ThermoFisher Scientific. Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer: Maintenance and Troubleshooting Guide. 2015;(100024234):1-4.
  116. Life Technologies Corporation. Attune™ Acoustic Focusing Cytometer: User Guide. 2015.
  117. Beckman Coulter. Navios™ EX Flow Cytometer: Instruction For Use. 2020.
  118. Absorption and Emission Spectra | BD Biosciences-US. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/product-selection-tools/spectrum-guide-page>
  119. DyLight Technology and Product Guide - ES. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-labeling/fluorescent-protein-labeling/dylight-fluors-technology-product-guide>
  120. Alexa Fluor 750 dye - ES. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-750>
  121. Texas Red (and Texas Red-X) Dye - ES. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/texas-red>
  122. World Health Organization. Manual of basic techniques for a health laboratory. Published online 2003: First edition published in 1980.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

123. Schroeder AB, Dobson ETA, Rueden CT, Tomancak P, Jug F, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein Sci.* 2021;30(1):234-249.
124. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(7-8):518-529.
125. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675.
126. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat Rec (Hoboken).* 2013;296(3):378-381.
127. Bardina J, Rico LG, Ward MD, Bradford JA, Juncà J, Petriz J. Flow Cytometric Quantification of Granulocytic Alkaline Phosphatase Activity in Unlysed Whole Blood. *Curr Protoc Cytom.* 2020;93(1):e76.
128. Maurer-spurej E, Pfeiler G, Maurer N, Lindner H, Glatter O, Devine D V. Room Temperature Activates Human Blood Platelets. 2001;81(4):581-592.
129. Keij JF, Rotterdam A Van, Groenewegen AC, Stokdijk W, Visser JWM. Coincidence in high-speed flow cytometry: Models and measurements. *Cytometry.* 1991;12(5):398-404.
130. van Rotterdam A, Keij J, Visser JW. Models for the electronic processing of flow cytometric data at high particle rates. *Cytometry.* 1992;13(2):149-154.
131. Parameters and Probes. In: Practical Flow Cytometry. John Wiley & Sons, Ltd; 2003:273-410.
132. Van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost.* 2012;10(5):919-930.
133. Libregts SFWM, Arkesteijn GJA, Németh A, Nolte-'t Hoen ENM, Wauben MHM. Flow cytometric analysis of extracellular vesicle subsets in plasma: impact of swarm by particles of non-interest. *J Thromb Haemost.* 2018;16(7):1423-1436.
134. Gohde HG. Process for automatic counting and measurement of particles. Published online 1975. Available from: <https://patents.google.com/patent/US4021117>
135. Hoffman RA. Pulse Width for Particle Sizing. *Curr Protoc Cytom.* 2009;50(1):1.23.1-1.23.17.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

136. Hughes OR, Stewart R, Dimmick I, Jones EA. A critical appraisal of factors affecting the accuracy of results obtained when using flow cytometry in stem cell investigations: where do you put your gates? *Cytom Part A*. 2009;75(9):803-810.
137. Loken MR, Herzenber LA. Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann N Y Acad Sci*. 1975;254:163-171.
138. Heinlein C, Deppert W, Braithwaite AW, Speidel D. A rapid and optimization-free procedure allows the in vivo detection of subtle cell cycle and ploidy alterations in tissues by flow cytometry. *Cell Cycle*. 2010;9(17):3584-3590.
139. Benson NA, Braylan RC. Evaluation of sensitivity in DNA aneuploidy detection using a mathematical model. *Cytometry*. 1994;15(1):53-58.
140. Shankey T V, Rabinovitch PS, Bagwell B, et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. International Society for Analytical Cytology. *Cytometry*. 1993;14(5):472-477.
141. Eudey TL. Statistical considerations in DNA flow cytometry. *Stat Sci*. 1996;11(4):320-334.
142. Wersto RP, Liblit RL, Koss LG. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: A review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol*. 1991;22(11):1085-1098.
143. Shankey TV, Kallioniemi O-P, Koslowski JM, et al. Consensus review of the clinical utility of dna content cytometry in prostate cancer. *Cytometry*. 1993;14(5):497-500.
144. Dressler LG, Bartow SA. DNA flow cytometry in solid tumors: practical aspects and clinical applications. *Semin Diagn Pathol*. 1989;6(1):55-82.
145. Bach BA, Knape WA, Edinger MG, Tubbs RR. Improved sensitivity and resolution in the flow cytometric DNA analysis of human solid tumor specimens. Use of in vitro fine-needle aspiration and uniform staining reagents. *Am J Clin Pathol*. 1991;96(5):615-627.
146. Cosma A. The Nightmare of a Single Cell: Being a Doublet. *Cytom Part A*. 2020;97(8):768-771.
147. Daubeuf S, Lindorfer MA, Taylor RP, Joly E, Hudrisier D. The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell. *J Immunol*. 2010;184(4):1897-1908.
148. HoWangYin K-Y, Caumartin J, Favier B, et al. Proper regrafting of Ig-like transcript 2 after trogocytosis allows a functional cell-cell transfer of sensitivity. *J Immunol*.

- 2011;186(4):2210-2218.
149. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol.* 2003;4(9):815.
  150. MacDonald HR, Zaech P. Light scatter analysis and sorting of cells activated in mixed leukocyte culture. *Cytometry.* 1982;3(1):55-58.
  151. Fraunhofer J von. Neue Modifikation Des Lichtes Durch Gegenseitige Einwirkung Und Beugung Der Strahlen, Und Gesetze Derselben. 1921.
  152. Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann Phys.* 1908;330(3):377-445.
  153. Böhmer RM, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Forward light scatter is a simple measure of T-cell activation and proliferation but is not universally suited for doublet discrimination. *Cytom Part A.* 2011;79(8):646-652.
  154. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry.* 1997;30(3):124-133.
  155. Cassens U, Gutensohn K, Garritsen H, Kelsch R, Kuehnl P, Sibrowski W. The influence of different erythrocyte lysing procedures on flow cytometric determination of CD34+ cells in umbilical cord blood transplants. *Transfus Med.* 1998;8(2):111-118.
  156. Von U. Suzuki KY and MT. Ueber ein Enzym "Phytase" das "Anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure" spaltet. *Bull Coll Agric Imp Univ Tokyo.* 1907;7-8:503-512.
  157. Kay HD. Plasma Phosphatase in Osteitis Deformans and in other Diseases of Bone. *Br J Exp Pathol.* 1929;10(4):253-256.
  158. Millán JL. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.* 2006;2(2):335-341.
  159. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem.* 2014;29(3):269-278.
  160. Rambaldi A, Terao M, Bettoni S, et al. Expression of leukocyte alkaline phosphatase gene in normal and leukemic cells: regulation of the transcript by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1990;76(12):2565-2571.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

161. Gomori G. The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J Cell Comp Physiol.* 1941;17(1):71-83.
162. TANAKA KR, VALENTINE WN, FREDRICKS RE. Diseases or clinical conditions associated with low leukocyte alkaline phosphatase. *N Engl J Med.* 1960;262:912-918.
163. Chikkappa G. Control of neutrophil alkaline phosphatase synthesis by cytokines in health and diseases. *Exp Hematol.* 1992;20(4):388-390.
164. Yuo A, Kitagawa S, Okabe T, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1987;70(2):404-411.
165. Kaplow LS. Leukocyte alkaline phosphatase in disease. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 1971;2(2):243-278.
166. KAPLOW LS. A Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow. *Blood.* 1955;10(10):1023-1029.
167. Menten ML, Junge J, Green MG. A coupling histochemical azo dye test for alkaline phosphatase in the kidney. *J Biol Chem.* 1944;153:471-477.
168. Vercauteren R. The intracellular distribution of alkaline and acid phosphatase in leucocytes. *Naturwissenschaften.* 1954;41(22):532.
169. Hayhoe FGJ, Quaglino D. Cytochemical Demonstration and Measurement of Leucocyte Alkaline Phosphatase Activity in Normal and Pathological States by a Modified Azo-Dye Coupling Technique. *Br J Haematol.* 1958;4(4):375-389.
170. Monis B, Rutenburg AM. Alkaline Phosphatase in Leucocytes by An Azo Dye Method. *Stain Technol.* 1959;34(6):339-342.
171. Spiers AS, Liew A, Baikie AG. Neutrophil alkaline phosphatase score in chronic granulocytic leukaemia: effects of splenectomy and antileukaemic drugs. *J Clin Pathol.* 1975;28(7):517-523.
172. Leukocyte Alkaline Phosphatase Scoring. Available from: <https://imagebank.hematology.org/imageset/411/leukocyte-alkaline-phosphatase-scoring>
173. LEUCOGNOST® ALPA Detection of the alkaline leukocyte phosphatase activity in leukocytes | 1163000002. Available from:

- <https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/LEUCOGNOST-ALPA-Detection-of-the-alkaline-leukocyte-phosphatase-activity-in-leukocytes,ES-1163000002>
174. Rambaldi A, Masuhara K, Borleri GM, et al. Flow cytometry of leucocyte alkaline phosphatase in normal and pathologic leucocytes. *Br J Haematol*. 1997;96(4):815-822.
  175. Eshel E, Sharabi-Nov A, Dally N. Leukocyte alkaline phosphatase (LAP) by flow cytometry. *MLO Med Lab Obs*. 2013;45(8):22,24,26.
  176. Kamalia N, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Limeback H. Direct flow cytometric quantification of alkaline phosphatase activity in rat bone marrow stromal cells. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1992;40(7):1059-1065.
  177. Wang X, Li S, Liu H, Wood M, Chen WR, Zheng B. Automated identification of analyzable metaphase chromosomes depicted on microscopic digital images. *J Biomed Inform*. 2008;41(2):264-271.
  178. Ly BCK, Dyer EB, Feig JL, Chien AL, Del Bino S. Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *J Invest Dermatol*. 2020;140(1):3-12.e1.
  179. Chmiel M, Słowiński M, Dasiewicz K. Lightness of the color measured by computer image analysis as a factor for assessing the quality of pork meat. *Meat Sci*. 2011;88(3):566-570.
  180. Baran R, Robert M, Suematsu M, Soga T, Tomita M. Visualization of three-way comparisons of omics data. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:72.
  181. Soda Y, Bakker E. Quantification of Colorimetric Data for Paper-Based Analytical Devices. *ACS sensors*. 2019;4(12):3093-3101.
  182. Smith AR. Color Gamut Transform Pairs. In: SIGGRAPH Comput. Graph. Vol 12. SIGGRAPH '78. Association for Computing Machinery; 1978:12–19.
  183. Taylor AB, Ioannou MS, Watanabe T, Hahn K, Chew T-L. Perceptually accurate display of two greyscale images as a single colour image. *J Microsc*. 2017;268(1):73-83.
  184. Light, Vision and Photometry. In: *Colorimetry*. John Wiley & Sons, Ltd; 2006:1-38.
  185. Color Vision and Color Specification Systems. In: *Colorimetry*. John Wiley & Sons, Ltd; 2006:39-62.
  186. CIE 1976 L\*a\*b\* colour space (17-23-076 | CIE). Commission Internationale de

- l'Eclairage. Available from: <https://cie.co.at/eilvterm/17-23-076>
187. Muthumbi A, Chaware A, Kim K, et al. Learned sensing: jointly optimized microscope hardware for accurate image classification. *Biomed Opt Express*. 2019;10(12):6351-6369.
  188. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-1826.
  189. Panch SR, Szymanski J, Savani BN, Stroncek DF. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(8):1241-1249.
  190. Gragert L, Eapen M, Williams E, et al. HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N Engl J Med*. 2014;371(4):339-348.
  191. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-496.
  192. Padmanabhan A. Cellular collection by apheresis. *Transfusion*. 2018;58(S1):598-604.
  193. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133(1):157-165.
  194. Gianni AM. Where do we stand with respect to the use of peripheral blood progenitor cells? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1994;5(9):781-784.
  195. Barnett, Granger, Storie, et al. Quality assessment of CD34+ stem cell enumeration: experience of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) using a unique stable whole blood preparation. *Br J Haematol*. 1998;102(2):553-565.
  196. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87(1):1-13.
  197. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000;18(6):1360-1377.
  198. Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D, et al. Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for

- Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21(10):995-1003.
199. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*. 1997;89(7):2233-2258.
200. Weeks FM, Yee GC, Bartfield AA, Wingard JR. The true cost of bone marrow transplantation. *Am J Med Sci*. 1997;314(2):101-112.
201. Hiwase DK, Hiwase S, Bailey M, Bollard G, Schwarzer AP. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol blood marrow Transplant*. 2008;14(1):116-124.
202. Kozuka T, Ikeda K, Teshima T, et al. Predictive value of circulating immature cell counts in peripheral blood for timing of peripheral blood progenitor cell collection after G-CSF plus chemotherapy-induced mobilization. *Transfusion*. 2002;42(11):1514-1522.
203. Marques JF, Vigorito AC, Aranha FJ, et al. Early total white blood cell recovery is a predictor of low number of apheresis and good CD34(+) cell yield. *Transfus Sci*. 2000;23(2):91-100.
204. Zubair AC, Grant R, Wu W, et al. Platelet count is a sensitive predictor of autologous peripheral blood progenitor cell collection yield in previously treated plasma cell disease patients. *Transfusion*. 2008;48(6):1106-1114.
205. Gutensohn K, Magens MM, Kuehnl P, Zeller W. Increasing the economic efficacy of peripheral blood progenitor cell collections by monitoring peripheral blood CD34+ concentrations. *Transfusion*. 2010;50(3):656-662.
206. Körbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*. 2001;98(10):2900-2908.
207. Hill QA, Buxton D, Pearce R, Gesinde MO, Smith GM, Cook G. An analysis of the optimal timing of peripheral blood stem cell harvesting following priming with cyclophosphamide and G-CSF. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(10):925-930.
208. Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Peccatori F, Magni M, Brando B, Ravagnani F GA. Milan protocol for clinical CD34+ cell estimation in peripheral blood for autografting in patients with cancer. In: Wunder E, Sovalat H, Henon PR SS, ed. *Hematopoietic Stem Cells: The Mulhouse Manual*. AlphaMed Press; 1994:23-30.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

209. Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, et al. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;70(1):10-18.
210. Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S, Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol.* 1994;22(10):1003-1010.
211. Barnett D, Granger V, Whitby L, Storie I, Reilly JT. Absolute CD4+ T-lymphocyte and CD34+ stem cell counts by single- platform flow cytometry: The way forward. *Br J Haematol.* 1999;106(4):1059-1062.
212. Naithani R, Dayal N, Dixit G. Single Versus Dual Platform Analysis for Hematopoietic Stem Cell Enumeration Using ISHAGE Protocol. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2017;33(3):370-374.
213. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, et al. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytom Part B Clin Cytom.* 2012;82B(1):9-17.
214. Brando B, Göhde WJ, Scarpati B, D'Avanzo G. The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. *Cytometry.* 2001;43(2):154-160.
215. Wang L, Zhang Y-Z, Choquette S, Gaigalas AK. Measurement of Microsphere Concentration Using a Flow Cytometer with Volumetric Sample Delivery. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 2014;119:629-643.
216. Mariani M, Colombo F, Assennato SM, et al. Evaluation of an easy and affordable flow cytometer for volumetric haematopoietic stem cell counting. *Blood Transfus.* 2014;12(3):416-420.
217. Lee G, Arepally GM. Anticoagulation techniques in apheresis: from heparin to citrate and beyond. *J Clin Apher.* 2012;27(3):117-125.
218. Sutherland DR, Keeney M, Gratama JW. Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Protoc Cytom.* 2003;Chapter 6:Unit 6.4.
219. Services H. Distribution of In Vitro Diagnostic Products Labeled for Research Use Only or Investigational Use Only. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. Published online 2013. Available from: <https://www.fda.gov/media/87374/download>

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

220. Services H. Guidance for Industry and FDA Staff Commercially Distributed Analyte Specific Reagents ( ASRs ): Frequently Asked Questions. Published online 2007. Available from: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/fda-guidance-for-industry-and-fda-staffcommercially-distributed-analyte-specific-reagents-asrs-frequently-asked-questions>
221. Overview of IVD Regulation | FDA. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/ivd-regulatory-assistance/overview-ivd-regulation>
222. The European Economic Area (EEA), Switzerland and the North. Available from: <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/169/el-espacio-economico-europeo-suiza-y-el-norte>
223. CE marking | Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs. Available from: [https://ec.europa.eu/growth/single-market/ce-marking\\_en](https://ec.europa.eu/growth/single-market/ce-marking_en)
224. Directive 98/79/EC of the European parliament and of the council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1998/79/oj>
225. CE IVD | Global Product Certification (GPC) | Audit Auditor Training Examination Qualification Certificate Certification Body. Available from: [https://www.gpc.center/ce\\_ivd\\_/585](https://www.gpc.center/ce_ivd_/585)
226. Wood EJ. Cellular and molecular immunology (5th ed.): Abbas A. K., and Lichtman, A. H. *Biochem Mol Biol Educ*. 2004;32(1):65-66.
227. Testa U, Pelosi E, Frankel A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomark Res*. 2014;2(1):4.
228. Cruz NM, Sugita M, Ewing-Crystal N, et al. Selection and characterization of antibody clones are critical for accurate flow cytometry-based monitoring of CD123 in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(4):978-982.
229. Ito T, Inaba M, Inaba K, et al. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*. 1999;163(3):1409-1419.
230. Sánchez-Martínez D, Baroni ML, Gutierrez-Agüera F, et al. Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2019;133(21):2291-2304.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

231. Ashman LK, Roberts MM, Gadd SJ, Cooper SJ, Juttner CA. Expression of a 150-kD cell surface antigen identified by monoclonal antibody YB5.B8 is associated with poor prognosis in acute non-lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res.* 1988;12(11-12):923-928.
232. Venkataraman G, Aguhar C, Kreitman RJ, Yuan CM, Stetler-Stevenson M. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(4):625-630.
233. Human Immunology Project Consortium. Available from: <https://www.immuneprofiling.org/hipc/page/show>
234. Gouveia BG, Rijo P, Gonçalo TS, Reis CP. Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(2):87-96.
235. Pachón G, Caragol I, Petriz J. Subjectivity and flow cytometric variability. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):396.
236. Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med.* 2000;6(7):833-836.
237. Vial JP, Lacombe F. Immunophenotyping of acute leukemia: utility of CD45 for blast cell identification. *Methods Cell Biol.* 2001;64:343-358.
238. Nguyen R, Perfetto S, Mahnke YD, Chattopadhyay P, Roederer M. Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design. *Cytom Part A.* 2013;83(3):306-315.
239. Hulspas R, Gorman MRGO, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2009;364(June):355-364.
240. Rehse MA, Corpuz S, Heimfeld S, Minie M, Yachimiak D. Use of fluorescence threshold triggering and high-speed flow cytometry for rare event detection. *Cytometry.* 1995;22(4):317-322.
241. Klockenbusch C, Kast J. Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:927585.
242. Sompuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A Molecular Mechanism of Formalin

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fixation and Antigen Retrieval. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(2):190-199.
243. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 2001;49(8):931-937.
244. Auerbach C, Moutschen-Dahmen M, Moutschen J. Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. *Mutat Res*. 1977;39(3-4):317-361.
245. Fritsch G, Printz D, Stimpfl M, et al. Quantification of CD34+ cells: comparison of methods. *Transfusion*. 1997;37(8):775-784.
246. Einwallner E, Subasic A, Strasser A, et al. Lysis matters: red cell lysis with FACS Lyse affects the flow cytometric enumeration of circulating leukemic blasts. *J Immunol Methods*. 2013;390(1-2):127-132.
247. Gisselø CG, Roer O, Hoffmann MH, Hansen MB, Taaning E, Johnsen HE. Assessing agreement between CD34 enumeration by flow cytometry and volumetric analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(8):699-703.
248. Gutensohn K, Nikolitsis A, Gramatzki M, Spitzer D, Buwitt-Beckmann U, Humpe A. Direct volumetric flow cytometric quantitation of CD34+ stem and progenitor cells. *Transfus Med*. 2012;22(3):205-210.
249. Origene. Available from: <https://www.origene.com/catalog/antibodies/primary-antibodies/sm1068ps/cd11b-itgam-mouse-monoclonal-antibody-clone-id-icrf44>
250. BioRad. Available from: <https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/human-cd11b-antibody-icrf44-mca551.html?f=purified>
251. Paulus JM. Platelet size in man. *Blood*. 1975;46(3):321-336.
252. Maecker HT, Rinfret A, D'Souza P, et al. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol*. 2005;6(1):13.



## ANEXO I



## 1. ARTÍCULO CIENTÍFICO ASOCIADO A LOS TRABAJOS DE LA TESIS

### DOCTORAL

1. **Bardina J**, Rico LG, Ward MD, Bradford JA, Juncà J, Petriz J. Flow Cytometric Quantification of Granulocytic Alkaline Phosphatase Activity in Unlysed Whole Blood. *Curr Protoc Cytom.* 2020 Jun;93(1):e76.

## 2. OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN LA ETAPA DE LA

### TESIS DOCTORAL

1. Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, **Bardina J**, Petriz J. Acoustophoretic Orientation of Red Blood Cells for Diagnosis of Red Cell Health and Pathology. *Sci Rep.* 2018 Oct 24;8(1):15705.
2. Espasa A, Torrents S, Morales-Indiano C, Rico LG, **Bardina J**, Ancochea A, Bistué-Rovira À, Linio R, Raya M, Vergara S, Juncà J, Grifols JR, Petriz J, Soria MG, Sorigue M. Diagnostic performance of the ClearLLab 10C B cell tube. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Sep 22.

### 3. COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES Y NACIONALES DE LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL

#### Del estudio I

1. **Título:** Differently cell doublet profiles: comparison of light scattering with fluorescence measurement techniques  
**Autores:** Bardina J, Rico LG, Bistué-Rovira À, Ward MD, Bradford JA, Petriz J  
**Tipo de comunicación:** Póster  
**Congreso:** CYTO 2018 – 33rd Congress of the International Society for Advancement in Cytometry. Praga, 28 abril - 2 mayo 2018

#### Del estudio II

1. **Título:** Flow cytometry quantification of granulocytic alkaline phosphatase activity in unlysed whole blood  
**Autores:** Bardina J, Rico LG, Juncà J, Bistué-Rovira À, Ward MD, Bradford JA, Petriz J  
**Tipo de comunicación:** Comunicación oral  
**Congreso:** XVI Congress of the Iberian Society of Cytometry. Salamanca, 9 - 11 mayo 2019
2. **Título:** Flow cytometry quantification of granulocytic alkaline phosphatase activity in unlysed whole blood  
**Autores:** Bardina J, Rico LG, Juncà J, Bistué-Rovira À, Ward MD, Bradford JA, Petriz J  
**Tipo de comunicación:** Póster  
**Congreso:** CYTO 2019 - 34th Congress of the International Society for Advancement in Cytometry. Vancouver, 22 - 26 junio 2019

### **Del estudio III**

1. **Título:** Direct true volumetric counting of CD34+ stem cells  
**Autores:** Bardina J, Rico LG, Bistué-Rovira À, Ward MD, Bradford JA, Petriz J  
**Tipo de comunicación:** Póster  
**Congreso:** ESCCA 2018 Conference – Annual Conference of the European Society for Clinical Cell Analysis. Valencia, 13 - 15 setiembre 2018

### **De los estudios I, II y III**

1. **Título:** The importance of flow cytometry in the advancement of translational science  
**Autores:** Bardina J, Juncà J, Rico LG, Bistué-Rovira À, Ward MD, Bradford JA, Petriz J  
**Tipo de comunicación:** Póster  
**Congreso:** ESCCA 2019 Conference – Annual Conference of the European Society for Clinical Cell Analysis. Bergen, 18 – 21 setiembre 2019

## 4. COMUNICACIÓN DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

### Del estudio II

1. **Título:** Hacia la automatización del análisis de una enzima clave en medicina: la fosfatasa alcalina granulocítica

**Portal web:** UAB Divulga

## ANEXO II



## ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO IV

- Anti-Human CD2 APC, clon 39C1.5
- Anti-Human CD2 APC, clon LT2
- Anti-Human CD2 FITC, clon S5.2
- Anti-Human CD2 FITC, clon LT2
- Anti-Human CD2 PE, clon 39C1.5
- Anti-Human CD2 PE, clon LT2
- Anti-Human CD2 PE-Cy7, clon S5.2
- Anti-Human CD2 PE-Cy7, clon LT2
- Anti-Human CD3 AF700, clon UCHT1
- Anti-Human CD3 APC, clon UCHT1
- Anti-Human CD3 APC-Cy7, clon SK7
- Anti-Human CD3 ECD, clon UCHT1
- Anti-Human CD3 FITC, clon UCHT1
- Anti-Human CD3 Pacific Blue, clon UCHT1
- Anti-Human CD3 PE-Cy7, clon UCHT1
- Anti-Human CD3 PE-Cy7, clon SK7
- Anti-Human CD3 PE-DyLight594, UCHT1
- Anti-Human CD4 APC, clon 13B8.2
- Anti-Human CD4 APC, clon MEM-241
- Anti-Human CD4 APC-Cy7, clon SK3
- Anti-Human CD4 APC-Cy7, clon MEM-241
- Anti-Human CD4 FITC, clon 13B8.2
- Anti-Human CD4 FITC, clon MEM-241
- Anti-Human CD4 Pacific Blue, clon 13B8.2
- Anti-Human CD4 Pacific Blue, clon MEM-241
- Anti-Human CD4 PE, clon 13B8.2
- Anti-Human CD4 PE, clon MEM-241
- Anti-Human CD4 PE-Cy7, clon SK3
- Anti-Human CD4 PE-Cy7, clon MEM-241
- Anti-Human CD4 PerCP-Cy5.5, clon SK3

- Anti-Human CD4 PerCP-Cy5.5, clon MEM-241
- Anti-Human CD5 APC, clon BL1a
- Anti-Human CD5 APC, clon L17F12
- Anti-Human CD5 FITC, clon BL1a
- Anti-Human CD5 FITC, clon L17F12
- Anti-Human CD5 Pacific Blue, clon BL1a
- Anti-Human CD5 Pacific Blue, clon L17F12
- Anti-Human CD5 PE-Cy7, clon L17F12
- Anti-Human CD5 PE-Cy7, clon L17F12
- Anti-Human CD5 PerCP-Cy5.5, clon L17F12
- Anti-Human CD7 APC, clon 8H8.1
- Anti-Human CD7 APC, clon 124-1D1
- Anti-Human CD7 FITC, clon M-T701
- Anti-Human CD7 FITC, clon 124-1D1
- Anti-Human CD7 PE, clon M-T701
- Anti-Human CD7 PE, clon 124-1D1
- Anti-Human CD8 AF700, clon 3B5
- Anti-Human CD8 AF700, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 APC, clon B9.11
- Anti-Human CD8 APC, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 APC-Cy7, clon SK1
- Anti-Human CD8 APC-Cy7, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 ECD, clon B9.11
- Anti-Human CD8 FITC, clon B9.11
- Anti-Human CD8 FITC, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 Pacific Blue, clon B9.11
- Anti-Human CD8 Pacific Blue, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 Pacific Orange, clon 3B5
- Anti-Human CD8 Pacific Orange, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 PE, clon B9.11
- Anti-Human CD8 PE, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 PE-DyLight594, clon MEM-31

- Anti-Human CD8 PerCP, clon SK1
- Anti-Human CD8 PerCP, clon MEM-31
- Anti-Human CD8 PerCP-Cy5.5, clon SK1
- Anti-Human CD8 PerCP-Cy5.5, clon MEM-31
- Anti-Human CD10 AF700, clon HI10a
- Anti-Human CD10 AF700, clon MEM-78
- Anti-Human CD10 APC, clon ALB1
- Anti-Human CD10 APC, clon MEM-78
- Anti-Human CD10 APC-H7, clon HI10a
- Anti-Human CD10 APC-Cy7, clon MEM-78
- Anti-Human CD10 PE-CF594, clon HI10a
- Anti-Human CD10 PE-DyLight594, clon MEM-78
- Anti-Human CD10 FITC, clon ALB1
- Anti-Human CD10 FITC, clon MEM-78
- Anti-Human CD10 PE, clon ALB1
- Anti-Human CD10 PE, clon MEM-78
- Anti-Human CD11b AF700, clon ICRF44
- Anti-Human CD11b AF700, clon VIM12
- Anti-Human CD11b FITC, clon Bear1
- Anti-Human CD11b FITC, clon ICRF44
- Anti-Human CD11b PE-Cy7, clon Bear-1
- Anti-Human CD11b PE-Cy7, clon ICRF44
- Anti-Human CD13 APC, clon Immu103.44
- Anti-Human CD13 APC, clon WM15
- Anti-Human CD13 ECD, clon Immu103.44
- Anti-Human CD13 FITC, clon SJ1D1
- Anti-Human CD13 FITC, clon WM15
- Anti-Human CD13 PE, clon SJ1D1
- Anti-Human CD13 PE, clon WM15
- Anti-Human CD13 PE-Cy7, clon L138
- Anti-Human CD13 PE-Cy7, clon WM15
- Anti-Human CD13 PE-DyLight594, clon WM15

- Anti-Human CD13 PerCP-Cy5.5, clon WM15
- Anti-Human CD14 ECD, clon RMO52
- Anti-Human CD14 FITC, clon RMO52
- Anti-Human CD14 FITC, clon MEM-15
- Anti-Human CD14 PE, clon MφP9
- Anti-Human CD14 PE, clon MEM-15
- Anti-Human CD14 PE-DyLight594, clon MEM-15
- Anti-Human CD16 APC, clon 3G8
- Anti-Human CD16 ECD, clon 3G8
- Anti-Human CD16 FITC, clon 3G8
- Anti-Human CD16 PE, clon 3G8
- Anti-Human CD16 PE-DyLight594, clon 3G8
- Anti-Human CD16 PerCP, clon 3G8
- Anti-Human CD16 Pacific Orange, clon 3G8
- Anti-Human CD19 APC, clon J3-119
- Anti-Human CD19 APC, clon LT19
- Anti-Human CD19 AF700, clon SJ25-C1
- Anti-Human CD19 AF700, clon LT19
- Anti-Human CD19 PE, clon J3-119
- Anti-Human CD19 PE, clon LT19
- Anti-Human CD19 PE-Cy7, clon SJ25C1
- Anti-Human CD19 PE-Cy7, clon LT19
- Anti-Human CD19 PE-DyLight594, clon LT19
- Anti-Human CD19 PE-DyLight594, clon SJ25-C1
- Anti-Human CD19 PerCP-Cy5.5, clon SJ25C1
- Anti-Human CD19 PerCP-Cy5.5, clon LT19
- Anti-Human CD20 APC, clon B9E9 (HRC20)
- Anti-Human CD20 APC, clon 2H7
- Anti-Human CD20 APC-Cy7, clon L27
- Anti-Human CD20 APC-Cy7, clon 2H7
- Anti-Human CD20 ECD, clon B9E9 (HRC20)
- Anti-Human CD20 Pacific Blue, clon B9E9 (HRC20)

- Anti-Human CD20 Pacific Blue, clon 2H7
- Anti-Human CD20 PE, clon B9E9 (HRC20)
- Anti-Human CD20 PE, clon 2H7
- Anti-Human CD20 PE-Cy7, clon L27
- Anti-Human CD20 PE-Cy7, clon 2H7
- Anti-Human CD20 PE-DyLight594, clon 2H7
- Anti-Human CD20 PerCP-Cy5.5, clon L27
- Anti-Human CD20 PerCP-Cy5.5, clon H27
- Anti-Human CD22 APC, clon SJ10.1H11
- Anti-Human CD22 APC, clon S-HCL-1
- Anti-Human CD22 PE, clon SJ10.1H11
- Anti-Human CD22 PE, clon S-HCL-1
- Anti-Human CD23 PE, clon 9P25
- Anti-Human CD23 PE, clon EBVCS-5
- Anti-Human CD23 PE-DyLight594, clon 9P25
- Anti-Human CD23 PE-DyLight594, clon EBVCS-5
- Anti-Human CD27 FITC, clon CLB-27/1
- Anti-Human CD27 FITC, clon LT27
- Anti-Human CD27 Pacific Blue, clon 1A4CD27
- Anti-Human CD27 Pacific Blue, clon LT27
- Anti-Human CD27 PE, clon 1A4CD27
- Anti-Human CD27 PE, clon LT27
- Anti-Human CD33 APC, clon D3HL60.251
- Anti-Human CD33 APC, clon WM53
- Anti-Human CD33 FITC, clon D3HL60.251
- Anti-Human CD33 FITC, clon WM53
- Anti-Human CD33 PE, clon D3HL60.251
- Anti-Human CD33 PE, clon WM53
- Anti-Human CD33 PE-Cy7, clon P67.6
- Anti-Human CD33 PE-Cy7, clon WM53
- Anti-Human CD33 PerCP-Cy5.5, clon P67.6
- Anti-Human CD33 PerCP-Cy5.5, clon WM53

- Anti-Human CD34 PE-DyLight594, clon 581
- Anti-Human CD38 APC-Cy7, clon HIT2
- Anti-Human CD38 APC-Cy7, clon LS198-4-3
- Anti-Human CD38 FITC, clon T16
- Anti-Human CD38 FITC, clon HIT2
- Anti-Human CD38 Pacific Blue, clon LS198-4-3
- Anti-Human CD38 Pacific Blue, clon HIT2
- Anti-Human CD38 PE, clon LS 198-4-3
- Anti-Human CD38 PE, clon HIT2
- Anti-Human CD38 PerCP-Cy5.5, clon HIT2
- Anti-Human CD41 APC, clon P2
- Anti-Human CD41 APC, clon MEM-06
- Anti-Human CD41 FITC, clon P2
- Anti-Human CD41 FITC, clon MEM-06
- Anti-Human CD41 PE, clon P2
- Anti-Human CD41 PE, clon MEM-06
- Anti-Human CD45 APC, clon 2D1
- Anti-Human CD45 APC-Cy7, clon 2D1
- Anti-Human CD45 FITC, clon J33
- Anti-Human CD45 FITC, clon 2D1
- Anti-Human CD45 PE-Cy7, clon HI30
- Anti-Human CD45 PE-Cy7, clon 2D1
- Anti-Human CD45 PerCP-Cy5.5, clon 2D1
- Anti-Human CD45 Pacific Blue, clon J33
- Anti-Human CD45 Pacific Blue, clon 2D1
- Anti-Human CD45 Pacific Orange, clon HI30
- Anti-Human CD45 Pacific Orange, clon 2D1
- Anti-Human CD56 APC, clon N901 (NKH-1)
- Anti-Human CD56 APC, clon LT56
- Anti-Human CD56 FITC, clon NCAM16.2
- Anti-Human CD56 FITC, clon LT56
- Anti-Human CD56 PE, clon N901 (NKH-1)

- Anti-Human CD56 PE, clon LT56
- Anti-Human CD56 PE-DyLight594, clon LT56
- Anti-Human CD56 PE-DyLight594, clon MEM-188
- Anti-Human CD56 PerCP-Cy5.5, clon B159
- Anti-Human CD56 PerCP-Cy5.5, clon LT56
- Anti-Human CD61 FITC, clon SZ21
- Anti-Human CD61 FITC, clon VIPL2
- Anti-Human CD71 AF700, clon M-A712
- Anti-Human CD71 AF700, clon MEM-75
- Anti-Human CD79a APC, clon HM47
- Anti-Human CD79a APC, clon HM57
- Anti-Human CD79a PE, clon HM47
- Anti-Human CD79a PE, clon HM57
- Anti-Human CD79a PerCP-Cy5.5, clon HM47
- Anti-Human CD79a PerCP-Cy5.5, clon HM57
- Anti-Human CD103 APC, clon 2G5
- Anti-Human CD103 APC, clon Ber-ACT8
- Anti-Human CD103 FITC, clon 2G5
- Anti-Human CD103 FITC, clon Ber-ACT8
- Anti-Human CD103 PE, clon Ber-ACT8
- Anti-Human CD103 PE, clon Ber-ACT8
- Anti-Human CD117 AF700, clon 104D2
- Anti-Human CD117 APC-AF750, clon 104D2D1
- Anti-Human CD117 APC-Cy7, clon 104D2
- Anti-Human CD117 APC-R700, clon YB5.B8
- Anti-Human CD117 FITC, clon 104D2
- Anti-Human CD117 PE, clon 104D2D1
- Anti-Human CD117 PE, clon 104D2
- Anti-Human CD117 PE-Cy7, clon 104D2
- Anti-Human CD123 FITC, clon 6H6
- Anti-Human CD123 PerCP-Cy5.5, clon 7G3
- Anti-Human CD123 PerCP-Cy5.5, clon 6H6

- Anti-Human HLA-DR AF700, clon G46-6
- Anti-Human HLA-DR AF700, clon L243
- Anti-Human HLA-DR FITC, clon Immu-357
- Anti-Human HLA-DR FITC, clon L243
- Anti-Human HLA-DR Pacific Blue, clon Immu-357
- Anti-Human HLA-DR Pacific Blue, clon L243
- Anti-Human HLA-DR PE, clon Immu-357
- Anti-Human HLA-DR PE, clon L243
- Anti-Human Kappa APC, policlonal
- Anti-Human Kappa APC, clon TB28-2
- Anti-Human Kappa FITC, policlonal
- Anti-Human Kappa FITC, clon TB28-2
- Anti-Human Kappa PE, policlonal
- Anti-Human Kappa PE, clon TB28-2
- Anti-Human Kappa Pacific Blue, clon TB28-2
- Anti-Human Kappa V450, clon TB28-2
- Anti-Human Lambda APC, clon 1-155-2
- Anti-Human Lambda APC-H7, clon 1-155-2
- Anti-Human Lambda FITC, policlonal
- Anti-Human Lambda FITC, clon 1-155-2
- Anti-Human Lambda PE, policlonal
- Anti-Human Lambda PE, clon 1-155-2
- Anti-Human Anti-Mieloperoxidasa FITC, clon CLB-MPO-1
- Anti-Human Anti-Mieloperoxidasa FITC, clon MPO421-8B2
- Anti-Human Anti-Mieloperoxidasa PE, clon CLB-MPO-1
- Anti-Human Anti-Mieloperoxidasa PE, clon MPO421-8B2