

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
-DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA-

**“DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE  
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TIPO B POR CITOMETRÍA DE  
FLUJO, SEGÚN EL TIPO DE PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA  
UTILIZADO (SANGRE PERIFÉRICA), EN POBLACIÓN SANA”**

Tesis presentada para la obtención del grado de Doctor por  
**Alejandro Muñoz Jiménez.**

Directores: Dr. Fernando Sáenz López de Rueda, Dr. José Luis Marengo  
de la Fuente y Dr. André Ballesteros Tato.

Tutor: Dr. Rogelio Garrido Teruel.

Sevilla, a 12 Septiembre del 2013.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>11</b>
1.1. Aplicaciones de la citometría de flujo.	12
1.2. Historia de la citometría de flujo.	13
1.3. Características generales de los citómetros de flujo.	16
1.3.1. El sistema óptico.	
1.3.2. Fuentes de luz.	
1.3.3. Detectores.	
1.3.4. Cámaras de flujo.	
1.3.5. Sistema de inyección de la muestra.	
1.3.6. Componente electrónico.	
1.4. Prestaciones de los citómetros.	20
1.5. Consideraciones sobre determinados aspectos de los citómetros de flujo. Los citómetros de flujo separadores.	21
1.6. Procesamiento de las muestras.	24
1.6.1. Preparación de suspensiones celulares/nucleares para citometría de flujo.	
1.6.2. Enriquecimiento celular.	
1.7. Fluorocromos para la citometría de flujo.	24
1.7.1. Técnicas inmunofluorescentes.	
1.7.2. Fluorocromos que se unen no covalentemente a estructuras celulares.	
1.7.3. Marcadores fluorescentes que son sensibles al microambiente que les rodea.	
1.8. Standards y controles.	28
1.8.1. Standards (patrones de normalidad).	
1.8.2. Controles.	
1.9. Procesamiento de los datos. El análisis de datos en citometría de flujo.	32
1.10. Técnicas inmunofluorescentes.	34
1.10.1. Incremento de la señal/ruido.	
1.10.1.1. Aumento de la señal fluorescente.	
1.10.1.2. Disminución del background y ruido.	
1.11. Estudio citométrico en el análisis de linfocitos B.	38
1.11.1. Linfopoyesis del linfocito B.	
1.11.2. The Freiburg, París and EUROClass Classifications.	
1.11.3. Clasificación B mature (Bm).	

<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.</b>	<b>46</b>
2.1. Hipótesis de trabajo.	
2.2. Objetivos.	
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>48</b>
3.1. Materiales utilizados.	48
3.1.1. Solución lisante BD FACS (Concentrada 10X).	48
3.1.1.1. Uso propuesto.	
3.1.1.2. Resumen y explicación.	
3.1.1.3. Principios del procedimiento.	
3.1.1.4. Reactivo.	
3.1.1.4.1. Reactivo suministrado.	
3.1.1.4.2. Preocupaciones.	
3.1.1.4.3. Instrucciones para diluir.	
3.1.1.5. Instrumento.	
3.1.1.6. Obtención y preparación de muestras.	
3.1.1.7. Preparación de las muestras.	
3.1.1.8. Limitaciones.	
3.1.1.9. Características de rendimiento.	
3.1.1.9.1. Precisión.	
3.1.1.9.2. Recuperación de globulos blancos.	
3.1.1.9.3. Lisis de glóbulos rojos.	
3.1.2. Fijador: Formaldehído al 5%.	54
3.1.2.1. Propiedades químicas.	
3.1.2.1.1. Solución de formaldehído.	
3.1.2.2. Protocolo de preparación de formaldehído al 5%.	
3.1.3. Facs Flow (PBS).	58
3.1.4. Sc-Antimouse compensation estándar.	59
3.1.5. FACs Canto II (ocho colores).	60
3.1.6. Reactivos/Fluorocromos utilizados. Marcadores de linfocitos B para la inmunofenotipificación.	61
3.1.6.1. Inmunoglobulina D.	61
3.1.6.1.1. Descripción general.	
3.1.6.1.1.1. Propiedades físico-químicas.	
3.1.6.1.1.2. Papel en la respuesta inmune.	
3.1.6.1.1.3. Niveles de IgD sérica en diversas enfermedades.	
3.1.6.1.1.3.1. Infecciones.	
3.1.6.1.1.3.2. Inmunodeficiencias.	
3.1.6.1.1.3.3. Enfermedades autoinmunes y alérgicas.	
3.1.6.1.1.3.4. Otras condiciones.	

3.1.6.1.1.3.5.	IgD monoclonal.	
3.1.6.1.2.	Características del fluorocromo (PE mouse anti-human IgD)	
3.1.6.2.	CD19.	68
3.1.6.2.1.	Descripción general.	
3.1.6.2.2.	Características del fluorocromo (APC-Cy™7 Mouse Anti-Human CD19).	
3.1.6.3.	CD38.	69
3.1.6.3.1.	Descripción general.	
3.1.6.3.2.	Características del fluorocromo (PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD38).	
3.1.6.4.	CD 27.	72
3.1.6.4.1.	Descripción general.	
3.1.6.4.2.	Características del fluorocromo (anti-Human CD27 APC).	
3.1.6.5.	CD 3.	73
3.1.6.5.1.	Descripción general.	
3.1.6.5.2.	Características del fluorocromo (Pacific Blue™ Mouse Anti-Human CD3).	
3.2.	Sujetos.	75
3.2.1.	Sujetos del estudio.	
3.2.2.	Criterios de inclusión.	
3.2.3.	Criterios de exclusión.	
3.2.3.1.	Padecer alguna de las siguientes causas de linfocitosis.	
3.2.3.2.	Padecer alguna de las siguientes causas de linfopenia.	
3.3.	Protocolo de estudio. Variables consideradas.	84
3.3.1.	Descripción de protocolos.	84
3.3.1.1.	Extracción de muestras.	84
3.3.1.2.	Procesamiento de la muestra.	85
3.3.1.2.1.	Procedimiento 1 (SF).	85
3.3.1.2.2.	Procedimiento 2 (FM).	86
3.3.1.2.3.	Procedimiento 3 (Lysis).	87
3.3.1.2.4.	Procedimiento 4 (SF24h).	88
3.3.1.2.5.	Diagrama aclaratorio.	89
3.3.1.3.	Procesamiento en el citómetro.	89
3.3.1.3.1.	Calibración del equipo.	
3.3.1.3.2.	Control de calidad de detectores con perlas multicolor.	
3.3.1.4.	Análisis de resultados.	91
3.3.2.	Variables consideradas.	92
3.4.	Metodología estadística.	97
3.4.1.	Tamaño muestral.	97
3.4.2.	Análisis estadístico.	97

3.4.3. Concordancia. Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) y método de Bland y Altman.	98
3.4.4. Coeficiente de confianza interna o alfa de Cronbach.	102
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>104</b>
4.1. Análisis descriptivo.	104
4.1.1. Estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B.	104
4.1.2. Estudio de intensidad de fluorescencia de los distintos fluorocromos en cada una de las subpoblaciones linfocitarias tipo B.	109
4.2. Estadística inferencial.	118
4.2.1. Estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B.	118
4.2.2. Estudio de intensidad de fluorescencia de los distintos fluorocromos en cada una de las subpoblaciones linfocitarias tipo B.	123
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>135</b>
5.1. Punto inicial. Ideas preliminares.	135
5.2. Discusión. En cuanto a las subpoblaciones linfocitarias.	140
5.3. Discusión. En cuanto a la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos.	146
5.3.1. Intensidad de fluorescencia de IgD y CD27. Clasificación EUROClass.	146
5.3.2. Intensidad de fluorescencia de IgD y CD38. Clasificación B mature.	150
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>155</b>
<b>7. RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL.</b>	<b>156</b>
7.1. Introducción	
7.2. Hipótesis y objetivos.	
7.3. Material y métodos.	
7.4. Resultados.	
7.5. Conclusiones.	
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>159</b>
<b>9. ANEXOS.</b>	<b>165</b>
9.1. ANEXO I	166
9.2. ANEXO II	217
9.3. ANEXO III	268

---

# AGRADECIMIENTOS

---

En estas líneas que siguen, quisiera agradecer a todo el grupo de personas que han contribuido a la ejecución de esta tesis, pasando por mi hogar, el laboratorio, la Facultad y mi lugar de trabajo: mi querido servicio de Reumatología *del H. U. Virgen de Valme (Sevilla)*.

Quiero agradecer a los doctores D. José Luis Marengo de la Fuente, “mi maestro” y Jefe de Servicio de Reumatología del *Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla)*, a D. Fernando Sáenz López de Rueda, profesor Titular de Traumatología y Ortopedia del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del *Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla)* y al Dr. en biología André Ballesteros Tato, perteneciente al *Troy Laboratory, del Strong Memorial Hospital of Rochester University (N.Y, USA)*. A todos ellos, le agradezco su dedicación, apoyo y consejos en la dirección de la presente tesis.

A Elides Marín, jefa de técnicos en laboratorio del Strong Memorial Hospital of Rochester University y especialmente al Dr. Ignacio Sanz, actualmente director del Emory’s Lowance Center for Human Immunology, quién hizo posible mi estancia en Rochester, prestándome toda su ayuda no sólo científica, sino también personal.

A mi mujer y toda mi familia, especialmente mi madre, por ser el estímulo cotidiano para ir rellenando estas líneas.

Y por último, dedicar este trabajo a mi amigo ya fallecido D. Juan José Roldán Rodríguez, quién desde su ternura innata e inteligencia bondadosa, me llevó a lugares donde ningún otro ser humano perfecto, fue capaz de alojarme.

# ABREVIATURAS.

---

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ANOVA: análisis de la varianza.
- ANS: anilino-naftalina-sulfato.
- AR: Artritis Reumatoide.
- ARN: ácido ribonucleico.
- BD: biosciences.
- Bm: B mature.
- Br: background relativo.
- Br: background relativo.
- CCI: coeficiente de correlación intraclase.
- CMF: citometría de flujo.
- CV: coeficiente de variación.
- CVr: coeficiente de variación robusto.
- DN: doble negativas.
- EBV: Epstein-Barr Virus.
- EBV: virus de Epstein-Barr.
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
- FACS: fluorescence-activated cell sorter.
- FITC: isotiocianato de fluoresceína.
- FL1: primera fluorescencia.
- FL2: segunda fluorescencia.
- FSC: forward scatter.
- GL: grados de libertad.
- Hz: hercios.
- Ig: inmunoglobulina.
- IL: interleukina.
- IRA: insuficiencia renal aguda.
- IRC: insuficiencia renal crónica.
- LES: lupus eritematoso sistémico.
- LISTA: list mode.
- MFI: media de fluorescencia.
- Min: minutos.
- ml: mililitro.
- N: número de sujetos.
- Nm: nanómetro.
- PBMC: peripheral blood mononuclear cells.
- PCP: pneumocystis carinii.
- PE: ficoeritrina.
- PG: pre-germinal.
- PMT: fotomultiplicador.
- PreGC: pre germinal cell.
- PTT: púrpura trombótica trombocitopénica.

- Qr: eficiencia relativa de detección de fluorescencia.
  - Qr: eficiencia relativa de detección de fluorescencia.
  - R.p.m: revoluciones por minuto.
  - r: coeficiente de correlación intraclase.
  - RDL: recuento diferencial leucocitario.
  - SC: compensación estándar.
  - SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
  - SSC: side scatter.
  - TBC: tuberculosis.
  - TNF: factor de necrosis tumoral.
  - VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.
  - WB: whole blood.
  - WBL: lysed whole blood.
-



# 1. INTRODUCCIÓN.

La citometría de flujo (CMF) se inició en la década de los 60 como un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas.

Se define como citómetro de flujo al aparato que es capaz de medir componentes y propiedades de células y organelas celulares (partículas biológicas) que fluyen en una suspensión celular. Los sorters tienen las mismas prestaciones y posibilidades que los citómetros de flujo pero con la capacidad adicional de separar partículas selectivamente de la suspensión líquida (*Tabla 1*).

Tabla 1: parámetros medibles por citometría de flujo.

	Estructurales	Funcionales
INTRÍNSECOS	Tamaño y forma celular. Granularidad citoplasmática. Contenido de pigmentos. Proteínas	Estado de Reducción-Oxidación.
EXTRÍNSECOS	Contenido DNA, RNA. Ratio bases de ADN. Estructura cromatínica. Proteínas totales o básicas. Grupos químicos. Antígenos. Azúcares de superficie. Estructura del citoesqueleto	Estudios de membrana. Actividad enzimática. Endocitosis. Síntesis de ADN. Receptores. Potencial de membrana. pH. Carga de superficie.

**CONCEPTO DE INMUNOFLORESCENCIA:** el término inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. Ya en 1941, Coons<sup>1</sup> informó de la aplicación de esta técnica para localizar antígenos y anticuerpos en secciones de tejido. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Kohler y Milstein<sup>2</sup> en 1975, incrementó dramáticamente el uso de la inmunofluorescencia para la identificación de antígenos de superficie celular.<sup>2</sup>

La fluorescencia ha sido usada para visualizar ciertas moléculas y estructuras por medio de la microscopia óptica durante muchos años. Esta ha encontrado una

extensa área de aplicación en la citometría de flujo. La capacidad para detectar simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 ó 18 fluorocromos de diferentes longitudes de onda, abre completamente el campo del análisis multiparamétrico.

Cuando una molécula absorbe luz, y por tanto energía, algunos de sus electrones pueden alcanzar una órbita de mayor energía. Se dice entonces que la molécula ha alcanzado un estado de excitación, y puede volver a su estado basal cuando estos electrones vuelven a su órbita de menor energía. En algunos compuestos el electrón excitado cae rápidamente, usualmente en nanosegundos, al estado basal, emitiendo un cuanto de luz o fotón y desprendiendo energía. Esta transición radiante se denomina *fluorescencia*.<sup>2</sup> A este tipo de compuestos se les denomina fluorescentes o *fluorocromos*.

El objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es asignar a cada célula a un grupo específico de células que compartan propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés. Por ejemplo, para el análisis de subpoblaciones linfocitarias se requiere seleccionar un área de trabajo distinguiendo los leucocitos por sus propiedades de dispersión de luz (tamaño contra complejidad celular). Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador, por ejemplo, del marcador CD4 para monitorear el progreso de la enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>3</sup>, entre muchas otras aplicaciones clínicas.

### **1. 1. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.**

La CMF se puede emplear para estudiar características estructurales y funcionales de células o partículas en suspensión. Las aplicaciones fundamentales de esta técnica se dan en biología y medicina y son la identificación de antígenos celulares mediante técnicas de inmunofluorescencia y el estudio del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) y fases del ciclo celular.<sup>4</sup>

La CMF se ha utilizado en biomedicina con diferentes objetivos:

- En hematología: contaje celular, fórmula leucocitaria, contaje reticulocitario, análisis de médula ósea.<sup>5,6</sup>
- En farmacología: estudios de cinética celular.
- En inmunología: subpoblaciones T, tipaje tisular, estimulación linfocitaria.
- En reumatología: Artritis Reumatoide (AR)<sup>7,8</sup>, Lupus Eritematoso Sistémico (LES)<sup>9</sup>,...
- En oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorizar tratamiento.
- En microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.
- En genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

## 1. 2. HISTORIA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.

El primer contador celular automático fue desarrollado por Moldavan (1934) y consistía en un tubo capilar por el que se hacían pasar células teñidas, el capilar estaba montado sobre un microscopio óptico con un objetivo sobre el cual había un detector fotoeléctrico que registraba el paso de células como un cambio en la luz que recibía. Tuvo muchos problemas con el grosor del capilar y obstrucción del mismo, dificultad en el mantenimiento de presiones y otros tantos inconvenientes.

Unos años más tarde Kielland (1941) patenta un modelo que parece ser igual al de Moldavan.<sup>2</sup>

Un importante avance para el desarrollo de la citometría de flujo se consiguió en 1953 al inventar Crosland y Taylor una cámara de flujo basada en la inyección de la muestra en el seno de un fluido de arrastre a través de un capilar que se estrecha y centra el flujo de la misma. Con este sistema se evitaban dos grandes problemas: a) el capilar tiene mayor diámetro con lo que su obstrucción es mucho más difícil; y b) permite mejor el enfoque de la muestra con la fuente de luz. Es la base de las cámaras que se usan en la actualidad.

W. Coulter había descrito poco antes (1949) el principio que lleva su nombre. Desarrolló un contador celular basado en el cambio que produce una partícula al pasar por un agujero en el que hay una diferencia de potencial conocida. En 1966 también usó cambios en ondas de radiofrecuencia.

En 1953 Parker y Horst describen el primer contador diferencial hematológico usando células teñidas en rojo (hematíes) y azul (leucocitos), luz visible y detectores para luz roja o azul.

Katmentsky (1965) introdujo dos avances capitales en la citometría: a) el uso de la espectrofotometría (luz absorbida) para cuantificar ADN; y b) la medida multiparamétrica de luz dispersada. Fue el primero en emplear histogramas biparamétricos. Algo más tarde desarrolló un sorter neumático. Con el tiempo se va introduciendo el empleo de sustancias fluorescentes que permiten una mejor señal/ruido que los colorantes de absorción.

En 1967-69 Van Dilla describe el primer citómetro de flujo con configuración ortogonal usando la cámara descrita por Crosland-Taylor. Demostraron la relación existente entre ploidía e intensidad de fluorescencia en la cuantificación de ADN, y producen histogramas donde se pueden visualizar las fases del ciclo celular (G0, G1, fase S, G2M).

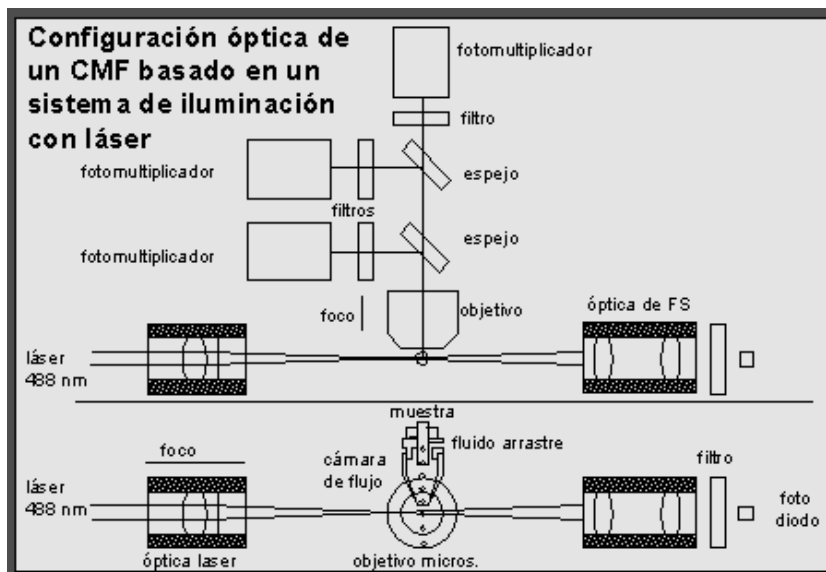


Imagen 2: citómetro de flujo basado en un sistema de iluminación con láser.

Fulwyler describe el proceso de sorter electrostático en 1965 basándose en la tecnología de las impresoras por chorro de tinta. Es el sistema mayoritariamente empleado en la actualidad.

Durante los años 60 y 70 se producen avances en la tecnología y su aplicación a la citometría de flujo pero hasta final de los años 70 y principio de los 80 existían pocas aplicaciones de la citometría de flujo de interés biológico. Los esfuerzos se dirigían principalmente en mejorar las prestaciones de los instrumentos que se estaban desarrollando.

Desde entonces se han producido avances en las aplicaciones de la citometría de flujo en la investigación médico-biológica. Los más importantes se describen a continuación:

- Reinherz (1975) emplea la tecnología de los anticuerpos monoclonales de Kohler y Milstein para identificar subpoblaciones celulares en función de antígenos de superficie.
- Loken (1977) mide simultáneamente dos antígenos celulares con un solo láser, emplea la compensación electrónica de la señal entre isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la tetralmetilrodamina.
- Oi (1982) introduce las ficobiliproteínas como fluorocromos (ficoeritrina).
- Darynkiewicz y Traganos (1976-79) estudian con naranja de acridina el ADN y ácido ribonucleico (ARN).
- Andreeff usa dicha técnica para clasificar las leucemias.
- Gryniewicz (1985) introduce el Indo 1 para medir concentración intracelular de calcio.
- Entre 1979-80 varios autores describen técnicas citométricas para medir condiciones fisiológicas: Visser (pH intracelular), Valet (carga de superficie), y Thorell (estado red-ox).
- Hedley (1983) pone a punto una técnica para el estudio por citometría de flujo del ADN de núcleos de muestras parafinadas.

- Gratzner (1975) describe la técnica de la bromodeoxiuridina (BrdU) y los anticuerpos contra ella, que permite ampliar el estudio de las fases del ciclo celular.
- Gray (1975) realiza el cariotipo por citometría de flujo. Este procedimiento fue posteriormente mejorado por Carrano.

Muchos otros autores han contribuido con sus experimentos a desarrollar técnicas aplicables a la citometría de flujo que ahora están dando sus frutos y se emplean tanto en el laboratorio de rutina, como en la investigación básica y/o clínica.

### 1. 3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CITÓMETROS DE FLUJO.

Para la lectura por citometría de flujo, las células son teñidas con fluorocromos que se unen específicamente a un constituyente celular. Las células son inyectadas en un flujo líquido laminar y pasan una a una por un punto de medida iluminado con luz de alta intensidad (láser). Cada célula en el punto de interacción produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo. Uno o varios detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman la señal a pulsos eléctricos. También se recoge la luz dispersada por la célula, que es función del tamaño, forma, y estructura de la misma.

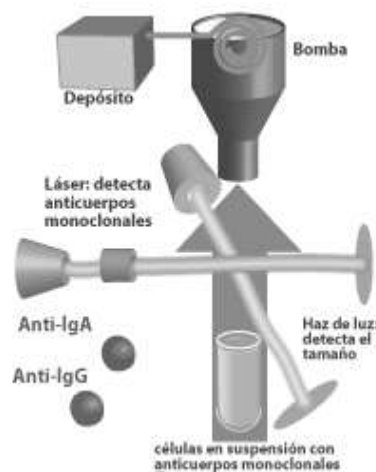


Imagen 3: componentes de un citómetro de flujo.

A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células (no una media de los resultados), y además permite medir características de poblaciones en muestras heterogéneas.

### 1. 3. 1. EL SISTEMA ÓPTICO.

Se debe considerar la fuente de iluminación (que puede ser un láser o una lámpara de arco voltaico), la señal de ruido, y los filtros necesarios para discriminar la señal lumínica y llevarla al detector adecuado.

**Instrumentos basados en una fuente de iluminación láser:** Tienen una configuración ortogonal, es decir que son perpendiculares los ejes de iluminación, detección y paso de muestra. El láser por acción de lentes tiene una sección elíptica y la intensidad de la luz decrece hacia la periferia de forma gaussiana. Su grosor se considera hasta que su intensidad ha disminuido del centro del haz al valor  $1/e^2$ , el cual es aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de ancho.

Algunos citómetros poseen dos o más láseres como fuentes de iluminación. La fluorescencia se recoge a 90 grados por lentes de alta apertura numérica. Recogen del 5 al 10 % de la fluorescencia emitida, pero con un espejo de diseño especial se puede llegar a recoger hasta el 90 %. Se debe situar una placa con un agujero (pinhole) para aumentar la razón señal/ruido. Por la lente que recoge la señal fluorescente también se recoge la señal de la luz dispersada a 90 grados (right angle scatter), que se lleva mediante espejos a su detector específico y es función de la refractariedad y estructura celular. Existe un detector para la luz dispersada hacia adelante o dispersión frontal de la luz (low angle scatter), que es función del tamaño celular. La cámara de flujo puede ser cerrada o abierta según la lectura se realice en el seno de la cámara o una vez el líquido ha abandonado la misma, hay que tener en cuenta que las cámaras cerradas producen menos señal de ruido que cuando la lectura es en aire.

**Instrumentos basados en lámparas de arco como fuente de iluminación:** Emplean una lámpara de mercurio o xenón con objetivos de alta apertura numérica y epiluminación. En algunos casos pueden detectar la dispersión de luz frontal.

**Ruido de fondo (background):** Se debe eliminar la luz que no sea la emitida o dispersada por las células. Hay que tener en cuenta la llamada luz dispersada de Raman (inelástica) por el agua que pasa de ser de 488 a 529/584 nm y no se puede eliminar por filtros. Para suprimir la luminiscencia de ruido se utilizan un pinhole.

**Filtros:** Se usan para eliminar y separar la luz recogida. Debe tener: (1) alta transmisión dentro de su banda de paso, (2) banda de paso limitada y estrecha, (3) baja autofluorescencia, (4) buena estabilidad y resistencia a la luz. Hay de dos tipos: (1) coloreados o de absorción: se usan como filtros de paso largo o "long pass", absorben la luz, y (2) de interferencia o dicroicos: reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar. No absorben la luz, sólo la reflejan.

### 1. 3. 2. FUENTES DE LUZ.

Existen láseres sintonizables o de emisión fija. Pueden ser refrigerados por agua o aire (menor potencia). Los más empleados son los de Argón o Kriptón.

Actualmente cada vez más se emplean los láseres de Argón de baja intensidad (10-15 mW) refrigerados por aire y que pueden ser usados en la mayor parte de aplicaciones citométricas.

También se pueden usar lámparas de arco de Mercurio o Xenón, pero su emisión decrece con el tiempo y son menos estables. Las ventajas más importantes de los citómetros con láser frente a los de lámpara son: mejor rendimiento para FITC, posibilidad de iluminación con dos o más láseres, y posibilidad de sorter celular.

### 1. 3. 3. DETECTORES.

Existen dos tipos de detectores de la luz: los fotomultiplicadores y los fotodetectores diodos o de estado-sólido.

**Fotomultiplicadores (PMT):** se usan para la detección de la señal de fluorescencia y luz dispersada a 90 grados. Tienen una buena ratio señal/ruido, aunque se eficiencia cuántica es baja. Hay dos tipos diferentes que se llaman end-on y side-window, la diferencia radica que el side-window tiene mayor rendimiento cuántico para las longitudes de onda que se usan en citometría pero la alineación es crítica.



**Fotodetectores diodos:** se usan para detectar la dispersión frontal de la luz. Son muy resistentes y eficientes (señales fuertes), pero tiene una baja ratio señal/ruido lo que los hace poco útiles para señales débiles.

#### 1. 3. 4. CÁMARAS DE FLUJO:

Son muy diferentes según sea la fuente de iluminación de aparato.

**Citómetros con fuente de iluminación láser:** Se basan en la cámara de flujo descrita por Crosland-Taylor (enfoque hidrodinámico). Hay dos tipos: las cerradas y las abiertas (detección en "chorro en aire").

Las cámaras cerradas consiguen flujos laminares con velocidades de flujo inferiores y producen menos ruido lumínico, en cambio no permiten una fácil eliminación de los coágulos o suciedad.

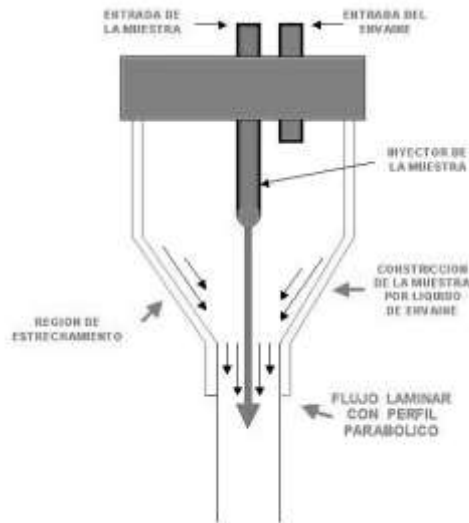


Imagen 4: boquilla de un citómetro de flujo.

**Citómetros con fuente de iluminación de arco:** hay varios sistemas, ya sean abiertos o cerrados. Generalmente los sistemas son más complejos que los de los citómetros basados en la iluminación tipo láser.

### **1. 3. 5. SISTEMAS DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA.**

Es muy importante que la velocidad sea constante (la velocidad óptima depende de la aplicación). Hay dos sistemas: (1) por presión, y (2) por inyección isovolumétrica por jeringa (permite velocidades inferiores de flujo y contar las células).

### **1. 3. 6. COMPONENTE ELECTRÓNICO.**

Los pulsos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador y después son convertidos de señal analógica a digital. Se pueden efectuar amplificaciones lineales a 256 canales (8 bits), 1024 canales (10 bits) o bien logarítmicas (3 ó 4 décadas). Existe la posibilidad de seleccionar un umbral de señal (las señales inferiores al umbral son desechadas). Después del procesamiento informático de la señal se obtienen histogramas mono o biparamétricos.

### **1. 4. PRESTACIONES DE LOS CITÓMETROS.**

Se evalúan en función de varios parámetros:

1.- Sensibilidad: cantidad mínima de moléculas de un fluorocromo determinado que pueden ser medidas con cierta precisión (resolución), para la luz dispersada, es el tamaño menor o índice de refracción que puede ser medido con cierta precisión. Depende de muchos factores, incluso del fluorocromo. Se puede decir que la sensibilidad aumenta si se disminuye la velocidad de flujo (paso) manteniendo constante el diámetro del flujo interno (muestra).

2.- Resolución (expresado como coeficiente de variación): es la reproductibilidad de la señal producida por idénticas células o partículas.

3.- Velocidad de medida: es la velocidad media máxima a la que las células pueden ser medidas sin exceder una frecuencia determinada de coincidencias (dos células detectadas como una sola). En los citómetros láser oscila alrededor de 5.000 células/segundo.

## 1. 5. CONSIDERACIONES SOBRE DETERMINADOS ASPECTOS DE LOS CITÓMETROS DE FLUJO. LOS CITÓMETROS DE FLUJO SEPARADORES.

**Propiedades hidrodinámicas de las cámaras de flujo de los citómetros de flujo:** todos los citómetros de flujo comparten un aspecto común: las partículas son obligadas a fluir hacia una región sensible donde se miden sus propiedades o características.

En los citómetros se necesita que las partículas fluyan con una trayectoria bien definida en el seno de un fluido de arrastre, que sea estrecha y estable; es decir que se requiere la presencia de un flujo laminar en la cámara de flujo (el flujo laminar se caracteriza por la no mezcla de las líneas de flujo del sistema; es decir que en un tubo en el que fluye un líquido en régimen laminar si se introduce un colorante, éste fluye por el sistema como una línea más o menos estrecha sin mezclarse con el líquido circundante). En 1883 Reynolds describió las características del flujo laminar y el número que lleva su nombre.

**Principio Coulter. Medición de tamaño por resistencia eléctrica:** Coulter describió en los años 50 un método para contar y medir el tamaño celular.

Las partículas suspendidas en un electrólito pasan a través de un agujero estrecho y corto, la resistencia eléctrica de las partículas y el medio debe ser suficientemente diferente. Una corriente constante se mantiene a través del orificio por dos electrodos, uno a cada lado. Cuando una partícula atraviesa el orificio desplaza al electrólito y produce un cambio en la resistencia eléctrica del sistema. Se demuestra que los pulsos son directamente proporcionales al tamaño de la partícula. Algunos citómetros incorporan éste principio para contar y medir el volumen celular.

**Dispersión de la luz y citometría:** la dispersión de la luz es un fenómeno complejo que tiene importantes usos en citometría, particularmente en discriminación celular. Se emplea la luz dispersada a 90 grados que es función de la estructura celular (diferencia de índices de refracción en la célula) y la luz dispersada a bajo grado (0,5 - 2/10/15 grados) que es función del tamaño celular.

También se ha empleado la luz polarizada para diferenciar varios tipos de leucocitos, o la dispersión multiángulo.

**Electrónica y procesamiento de la señal:** es un aspecto muy importante, sobre todo para el proceso de sorting. Actualmente se encuentran disponibles un gran número de programas informáticos para el estudio de las señales medidas por los citómetros.

**Separación (sorter) por citometría de flujo de partículas biológicas:** los citómetros de flujo sorters separan células individualizadas en función de características determinadas cuando han pasado (fluyendo) por uno o más mecanismos detectores.

Tienen menor potencia que las técnicas de separación masiva (centrifugación, etc...), pero permiten separaciones que estas técnicas no consiguen. Ahora se puede hacer separación magnética semejante al sorter.

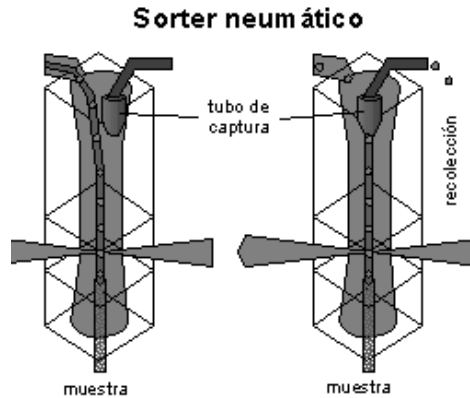
*Los sorters se caracterizan por:*

- Recuperación (recovery): porcentaje de partículas sorteadas recogidas en el colector del total de partículas activadas por el sorter.
- Pureza (purity): porcentaje de partículas sorteadas recogidas que cumplen los criterios seleccionados en función del total sorteado.
- Eficiencia: porcentaje de partículas activadas para sorter en función del total de partículas que cumplirían los requisitos que fluyen. La aplicación general de los sorters es la separación de subpoblaciones definidas por análisis citométrico.

*Tipos de sorters:*

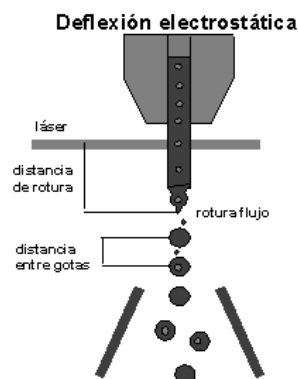
**a. Sorters neumáticos:** Emplean jeringas, energía acústica,... para desviar el flujo líquido durante algunos milisegundos y con él la célula seleccionada. Son sistemas cerrados que son seguros en cuanto a

contaminación y evaporación, son poco complicados, baratos y adaptables. En contraposición su velocidad es muy baja. Existe algún aparato comercial que emplea este sistema de separación.



**b. Sorters de deflexión electrostática:** Son complejos y necesitan de un gran soporte tecnológico e informático. Funcionan de un modo similar a las impresoras por chorro de tinta, y son los de mayor difusión. Son los más empleados. El primero fue descrito por Fulwyler (1965), y Bonner, en 1972, el primero en aplicar el sorter en función de señales fluorescentes.

El transductor para la formación de gotas es un cristal piezoeléctrico acoplado al vibrador; la energía que se usa es muy baja y no causa daño celular. El proceso de la ruptura del flujo es función de la velocidad de oscilación y del diámetro del orificio de sorter. Debe existir un dispositivo para visualizar la formación de las gotas (cámara estroboscópica), compensación de carga de las gotas, detector de coincidencias y abortador de sorter.



**c. Sorters de alta velocidad:** Pueden reducir de 5 a 8 veces el tiempo necesario de sorter. Un sorter convencional produce 20-40.000 gotas/segundo y procesa alrededor de 2-3.000 partículas/segundo; el los sorters de alta velocidad se producen 200.000 gotas/segundo y se pueden procesar 16.000 partículas cada segundo, esto produce un descenso en la eficiencia. El aumento de la velocidad se consigue disminuyendo el diámetro del orificio de sorter, aumentando la frecuencia de vibración (220 Hz) y la velocidad del flujo (50 metros/segundo); ésta situación en las cámaras de flujo convencionales conduciría a la pérdida del flujo laminar pero en los sorters de alta velocidad se mantiene con diseños especiales de las cámaras, y con trayectos de alineamiento e interacción luz-célula muy cortos.

## **1. 6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.**

Debido a las especiales características de los citómetros de flujo, la muestra a analizar debe encontrarse en forma de suspensión monodispersa. Hay muestras como la sangre periférica, médula ósea u otros fluidos biológicos, que precisan de un mínimo procesamiento; en cambio los tumores sólidos o las muestras parafinadas necesitan de una disgregación más o menos intensa (mecánica, enzimática, etc.).

En ocasiones puede ser conveniente o necesario enriquecer la concentración celular en la muestra antes de su procesamiento por citometría, ya sea para obtener una concentración celular adecuada para la incubación con los reactivos, o para acelerar el proceso de sorting.

### **1. 6.1. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES/NUCLEARES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Un factor limitante común en citometría de flujo es la disponibilidad de una suspensión celular, para estudiar sus características y relacionar o extrapolar sus resultados a fenómenos "in vivo". Para ello la suspensión celular debe cumplir una serie de requisitos: (1) representatividad del tejido, (2) suspensiones celulares de alta

calidad, con pocos agregados y bajo coeficiente de variación (CV), (3) preservación de las características celulares, y (4) suficiente muestra celular.

**Disgregación de material fresco (células):** cuando el tejido es sólido se emplean métodos mecánicos o enzimáticos basados en tripsina, proteasas, colagenasas, hialuronidasas, DNAasa o cocktails de ellas. Todos estos procedimientos tienen limitaciones (alteración de las características celulares o antígenos de membrana) y varía su efectividad según el tipo de tejido. Si queremos analizar en inmunofenotipo de superficie debemos emplear sólo métodos mecánicos o asegurarnos que los antígenos celulares no son destruidos por el procedimiento.

**Disgregación de material fresco (núcleos):** la preparación de suspensiones nucleares es una alternativa para el análisis del ADN. Vindelov fue el primero en desarrollar un buen método. Es importante hacer notar que los métodos líticos no conducen a una disminución del número de mitosis puesto que éstas se retienen (comprobado por microscopía) por puentes intercromosómicos.

**Disgregación de material parafinado:** procedimientos basados en el método desarrollado por Hedley en 1983. Sirve para muestras archivadas con más de 10 años de antigüedad. En un 10-15 % de casos se obtienen CV superiores al 10 % que no permiten el análisis del ciclo celular.

Se obtienen histogramas casi idénticos si el tumor es procesado en fresco o después de parafinización, si no hay pérdida celular selectiva durante el procesamiento; además los índices de ADN son casi idénticos y sólo se advierte una disminución del porcentaje de aneuploidías en tumores con índices de ADN muy bajos (por el aumento del CV de los picos).

Se pueden procesar y estudiar las muestras con patrones internos de ploidía (hematíes de pollo), pero en los tumores suele quedar algo de población normal residual y es mejor emplear estas células como control de diploidía de ADN. Para analizar los histogramas de ADN hace falta software especial (discriminación de ruido continuo por núcleos cortados, aproximación matemática para el cálculo de las fases).

### 1. 6. 2. ENRIQUECIMIENTO CELULAR.

Existen diversos métodos de separación y enriquecimiento celular basados en las características físicas, químicas y funcionales de las células. Los más empleados son los basados en el tamaño y densidad celular (centrifugación).

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)	Em-Max (nm)
Alexa Fluor® 405	Blue	401	360, 405, 407	421
Pacific Blue®	Blue	405	360, 405, 407	455
AmCyan	Green	457	405, 407	491
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 564	488, 532	578
PE-Texas Red®	Orange	496, 564	488, 532	615
Texas Red®**	Orange	595	595	615
APC*	Red	650	595, 633, 635, 647	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	595, 633, 635, 647	668
PE-Cy5*	Red	496, 564	488, 532	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy5.5	Far Red	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700***	Far Red	696	633, 635	719
PE-Cy7	InfraRed¹	496, 564	488, 532	785
APC-Cy7	InfraRed¹	650	595, 633, 635, 647	785

Imagen 5: principales fluorocromos, color de emisión, excitación y emisión máxima.

El enriquecimiento previo en citometría beneficia sobre todo al sorting. Suponiendo igual pureza, tiempo muerto y generación de gotas, si se aumenta la riqueza celular de las partículas a sortear en la suspensión celular se aumenta el flujo de partículas seleccionadas, aumentándose el número de eventos procesados y activados, y por lo tanto la velocidad de sorter. Para una concentración de células a sortear de 0,1 que se aumenta a 0,8 se aumenta la velocidad de sorter en 44 veces.

### 1. 7. FLUOROCROMOS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células.

Hay dos modos de uso: (1) unión covalente del fluorocromo a moléculas que se unen específicamente a componentes celulares, y (2) fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea.



Las propiedades ideales de un fluorocromo son: (1) alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz), (2) alto rendimiento cuántico (emisión de luz), (3) elevada fotoestabilidad, (4) corto estado de excitación. Si el fluorocromo va a estar unido a algo, éste ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente. Recordar que a longitudes de onda inferiores a 500 nm se produce una alta autofluorescencia celular debido a las flavinas.

### **1. 7. 1.- TÉCNICAS INMUNOFLOURESCENTES**

Marcadores fluorescentes de unión covalente: Son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o bien otras moléculas biológicas. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos.

Se emplean cromóforos con grupos isotiocianato, clorotrizinil, y ésteres de succinimida, por su capacidad de unión. El fluorocromo más empleado es la FLUORESCINA. Otros que se han descrito y empleado son: rodamina, Texas red, cianinas (láseres diodos), etc., pero el más famoso es la FICOERITRINA (ficobiliproteína) por su gran absorción, rendimiento y fotoestabilidad; además se puede excitar a 488 nm pero emite más allá del espectro de la fluoresceína permitiendo el doble análisis con un solo láser. Avances recientes son el uso de sondas de ADN unidas a fluoresceína, y los anticuerpos anti-bromodeoxiuridina para el estudio del ciclo celular.

Actualmente se ha generalizado el estudio multiparamétrico de antígenos celulares con el empleo simultáneo de 3 y 4 anticuerpos conjugados cada uno con fluorocromos con diferente longitud de emisión (FITC; R-PE, PerCP, AFC, tándems de fluorocromos,...).

### **1. 7. 2. FLUOROCROMOS QUE SE UNEN NO COVALENTEMENTE A ESTRUCTURAS CELULARES.**

Son fluorocromos que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares.

- **Marcadores del contenido en ADN y ARN:** Según el tipo son más o menos específicos para el ADN, ARN, o determinadas bases. Se emplean

el Hoechst 33342 (Unión a A-T, vital), DAPI (A-T), DIPI (A-T), cromomicina A3 (Unión a G-C), olivomicina (G-C), mitramicina (G-C). El naranja de acridina se une al ADN y ARN pero tiene la particularidad de emitir en diferente longitud según al tipo de ácido nucleico al que está unido. De uso común es el yoduro de propidio (unión intercalante) que se excita con un láser de 488 nm.

- **Marcadores del potencial de membrana:** son las cianinas y la rodamina 123. También marcar mitocondrias debido a la alta diferencia de potencial entre su membrana.
- **Marcadores de membrana y lípidos, marcadores que diferencian compartimentos con distinto pH:** poco usados en citometría de flujo.

### **1. 7. 3. MARCADORES FLUORESCENTES QUE SON SENSIBLES AL MICROAMBIENTE QUE LES RODEA.**

Ciertos fluorocromos pueden ser empleados para estimar las propiedades del ambiente en el que se encuentran, puesto que varían su espectro de absorción o emisión en función de las características del microambiente que les rodea.

Se emplean para la determinación de diversos estados funcionales celulares: pH (6-carboxi-fluoresceína, 2,3-diciano-1,4-dihidroxidenceno, hidroxipireno trisulfato), calcio (quin II, fura-2, indo-1), potencial red-ox (diclorofluoresceína, NADH, NADHP), actividad enzimática (substratos que por acción del enzima varían su fluorescencia o espectro), polaridad (anilino-naftalina-sulfato o ANS), y viscosidad/fluidez.

La disponibilidad de fluorocromos específicos y con altas prestaciones es esencial para el desarrollo de aplicaciones por citometría de flujo.

### **1. 8. ESTÁNDARDS Y CONTROLES.**

#### **1. 8. 1. STANDARDS (PATRONES DE NORMALIDAD).**

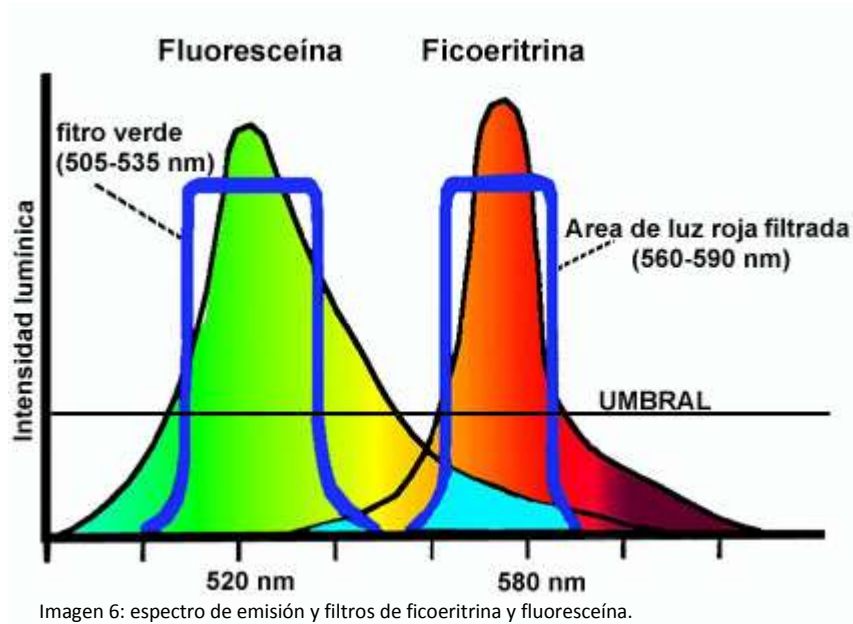
Un standard es un material estable que tiene unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de luz. Se usan para alinear o calibrar las prestaciones del citómetro de flujo. Hay de comerciales o se los puede preparar uno mismo.

**Alineamiento y prestaciones:** el uso de standards de alineamiento proporciona un buen método para detectar cambios y problemas en la configuración óptica y señal de un día a otro. El citómetro de flujo se considera alineado cuando se consigue una elevada fluorescencia o señal con un bajo CV. Se debe comprobar para todas las señales y llegar a un compromiso entre ellas porque a veces cuando una aumenta la otra disminuye.

**Calibración (ajuste de escalas):** los citómetros de flujo ofrecen una información relativa, no absoluta. Para cuantificar hay que correlacionar los canales con resultados de muestras conocidas. El método más sencillo consiste en ajustar el voltaje del fotodetector (produce cambios exponenciales o no-lineales de la señal) y/o ganancias (crecimiento lineal) para conseguir un pico de una intensidad determinada de un standard estable cada día. Es el equivalente a reelegir el citómetro a una escala de intensidad relativa constante. También es útil hacer una calibración cruzada de escalas logarítmicas y lineales.

**Compensación de color:** en las aplicaciones citométricas con dos o más fluorescencias nuestro objetivo es marcar las células con fluorocromos distintos que reflejen las diversas propiedades celulares diferentes y detectar la señal proporcional a la primera fluorescencia (FL1) en un detector y la de la segunda (FL2), etc, sin desviaciones producidas por interferencias de la señal. Los fluorocromos tienen espectros de emisión que en ocasiones se superponen y los filtros no son perfectos, por ello los citómetros poseen un sistema informático de compensación o sustracción de señal.

Es difícil predecir teóricamente el grado de compensación y hay que ajustarlo individualmente. Generalmente se debe extraer FL1 (fluoresceína) de FL2 (ficoeritrina), y también FL3 (ioduro de propidio) a FL2 y FL1 (fluoresceína).



**El tiempo como standard:** en los citómetros que lo permiten, se pueden hacer gráficas del número de células procesadas, del canal de fluorescencia, etc,... a lo largo del tiempo. Se puede usar para ver la estabilidad de las mediciones del citómetro con el tiempo y detectar la presencia de algún problema.

**Standardización del procedimiento de sorting:** la validez de nuestras conclusiones depende de la pureza del resultado ya que el tiempo sólo depende de la eficiencia del sorting. Se producen más gotas vacías que con células y generalmente se sorteán tres gotas por evento activado. Para calcular el retardo se hacen pruebas hasta conseguir la mejor recuperación (mínimo del 95 %). Si se desea mirar también la pureza, se utilizan bolas de dos colores y se establece una ventana de sorter sobre unas de ellas. Cuando el número de células a sortear debe ser preciso se pueden mezclar bolas con la muestra y calcular el porcentaje de recuperación de ellas, sabiendo éste (que se cuenta durante la separación) se asume que es el mismo que para las células, y se calcula el número total de eventos a procesar para conseguir el número total de células deseadas.

La monitorización en tiempo real de la velocidad de adquisición puede proporcionar información continuada de que no hay problemas en el correcto funcionamiento del citómetro.

**Control de calidad:** Hay que asegurarse que el citómetro funciona bien cada día para poder comparar los resultados.

Hay dos métodos: (1) no variar las condiciones de lectura y apuntar el canal medio del pico standard y hacer curvas de día a día, y (2) fijar la posición constante del pico del standard variando las condiciones de lectura (fotodetectores) y hacer curvas. Las dos son válidas pero es más sencilla la primera porque la segunda tiene una variación no-lineal. Se pueden hacer ambas.

### **1. 8. 2. CONTROLES.**

Los controles son un material que produce unos resultados esperados (conocidos). Se usan para monitorizar las prestaciones o reproductibilidad de los reactivos y la calidad de los métodos de preparación celular. Son importantes en los análisis de ADN e inmunofluorescencia. Generalmente se usan controles de ploidía y controles de inmunofluorescencia positivos y negativos.

**Controles para cuantificación de ADN y análisis de las fases del ciclo celular:** como control de ploidía se debe usar un control interno, procesado en el mismo tubo que la muestra, para descartar o asegurar aneuploidía y calcular en índice de ADN (también se puede procesar por separado y mezclar), y otro tubo para calcular las fases del ciclo celular.

Las mejores células de referencia son células diploides del mismo individuo e igual tejido. Si no pudiera obtenerse debería ser al menos de igual tejido; de diferente individuo y tejido; o de otra especie animal.

Para realizar una buena lectura de ADN se debe tener al citómetro de flujo en perfectas condiciones y ser cuidadoso en el proceso de preparación de la muestra y tinción. Se deben usar controles. El análisis e interpretación se hace mediante el software adecuado.

**Inmunofluorescencia:** el objetivo de los análisis de inmunofluorescencia es usar reactivos específicos para identificar subpoblaciones celulares. Se necesitan controles

negativos para descartar unión inespecífica del fluorocromo y seleccionar el umbral de autofluorescencia.

Son causas de tinción inespecífica los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas, las células muertas, etc. Si tenemos problemas con el control negativo se debe procurar procesar con cuidado las muestras preservando su viabilidad, utilizar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> o centrifugar el anticuerpo monoclonal para evitar agregados, eliminar las células muertas con doble marcaje con yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína. Si a pesar de todo seguimos obteniendo una distribución unimodal con considerable superposición entre el control negativo y el control positivo, podemos asumir (con ciertas reservas) que la tinción es específica pero de baja intensidad (no es seguro).

Los controles positivos son también esenciales para comprobar que la técnica funciona. Si no se emplean los resultados negativos de una muestra que se espera positiva no se sabe si son por alteración antigénica o fallo de marcaje.

## **1. 9. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS. EL ANÁLISIS DE DATOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Los citómetros producen una gran cantidad de información que puede ser guardada en forma de histogramas (histogramas monoparamétricos de 256 ó 1024 canales, histogramas biparamétricos de 64 x 64 = 4096 puntos) o en modo LISTA (list mode) que consiste en guardar toda la información obtenida para cada evento de modo que se pueden modificar las regiones de análisis y reconstruir los histogramas en función de nuevos parámetros de selección. Para evitar interpretaciones subjetivas y aprovechar al máximo la información obtenida es necesaria la ayuda de la informática y pruebas matemáticas estadísticas.

La citometría de flujo permite el estudio de múltiples características celulares combinando las lecturas sobre señales de dispersión de luz y señales fluorescentes. El empleo de fluorocromos con longitudes de onda de excitación compatibles con la fuente de luz del citómetro (generalmente 488 nm, pero pueden ser otras) y con

distintos espectros de emisión posibilita el estudio simultáneo de varias propiedades o características sobre células incluso en muestras heterogéneas.

**A. 1. DATOS UNIVARIANTES (HISTOGRAMAS MONOPARAMÉTRICOS):** Suelen ser representados como un histograma. Un método rápido y sencillo de interpretación es la observación del histograma y la ayuda del soporte informático del citómetro para calcular el porcentaje de eventos en regiones seleccionadas. Hay que tener en cuenta la resolución del histograma para la discriminación de la señal y el CV (en un histograma de 100 canales con un CV del 2 % no se podrían discriminar 32 picos de cromosomas). Cuando deseamos una información precisa interesa un histograma con el mayor número de canales posibles. Para el estudio del inmunofenotipo en que interesa positividad o negatividad, escalas pequeñas con pocos canales pueden ser suficientes. 1.1.- Métodos no paramétricos: se basan en la observación del histograma y posición de los cursores (células positivas). Un problema especial son las muestras con baja fluorescencia que se diferencian poco del negativo (generalmente una subpoblación puede ser claramente identificada si tiene un elevado número de células o alta señal fluorescente), se emplean métodos de normalización y sustracción de la señal con comparaciones de curvas (Kolmogorov-Smirnov). En ocasiones puede ser útil la suavización (smooth) del contorno del histograma (también en análisis del ADN con pocos eventos). La transformación o uso de escalas logarítmicas es útil en caso de que la señal sea muy amplia o se halle muy dispersa puesto que agrupa los canales de señal alta y permite diferenciar igualmente el control negativo.

**A. 2. MÉTODOS PARAMÉTRICOS:** en algunos casos por la dificultad de interpretación de los datos y la elevada información que contiene es necesario aplicar modelos matemáticos. En ellos se emplean conversiones matemáticas de los histogramas y sus datos a curvas o ecuaciones. Se usan en el análisis de las distribuciones de ADN y modelos de cinética celular.

**B. DATOS BIVARIANTES (HISTOGRAMAS BIPARAMÉTRICOS):** En los métodos no paramétricos se emplean porcentajes, canales y CV de ventanas o regiones amorfas de análisis. Se presentan como histogramas biparamétricos con dos ejes y el número de eventos se representa como densidad de puntos, colores, o líneas isométricas. En el

análisis paramétrico se emplean métodos matemáticos, y en el caso del ADN se asemejan los picos a gaussianas volumétricas. Dada la gran información que manejan se necesitan ordenadores muy potentes.

En el análisis multiparamétrico la principal dificultad es la limitación humana de poder manejar cómodamente y de forma comprensible información relativa a más de tres variables simultáneamente. Se necesitan modelos matemáticos de componentes principales, agrupación y clasificación para analizar la compleja información. La información se representa en forma de múltiples histogramas mono/biparamétricos, cubos tridimensionales, y matrices de datos.

### 1. 10. TÉCNICAS INMUNOFLORESCENTES, INMUNOFENOTIPAJE:

Durante el proceso de diferenciación y maduración celular se expresan genes que son necesarios para el correcto desarrollo y función celular. Algunos de los productos específicos del gen se expresan en la superficie celular, mientras que otros son intracelulares. Ello permite caracterizar subpoblaciones celulares.

La respuesta inmune se desencadena cuando una sustancia extraña (antígeno) entra en el organismo. Una parte de los linfocitos B se estimulan y secretan proteínas llamadas inmunoglobulinas (anticuerpos) que neutralizan las sustancias extrañas. Un linfocito B sólo sintetiza un solo tipo de inmunoglobulina. Las pruebas inmunológicas se han visto ayudadas por el desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos tienen dos terminaciones: una responsable de la especificidad (Fab), y otra región constante (Fc). Tienen una exquisita especificidad y pueden distinguir entre pequeñas diferencias de estructuras tridimensionales.

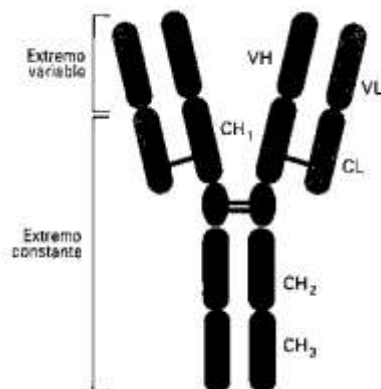


Imagen 7: estructura de un anticuerpo. Se pueden observar las dos terminaciones: extremo variable y constante.



El fluorocromo que se conjuga al anticuerpo actúa como un simple marcador con el que se pueden marcar distintos anticuerpos (facilita la estandarización del sistema óptico del citómetro). La unión del anticuerpo a la célula no la mata, lo cual permite establecer sorters para posterior caracterización funcional o bioquímica en función de marcadores celulares de superficie.

Factores limitantes que deben ser tenidos en consideración es que la frecuencia relativa de las células condiciona la estrategia de marcaje para su búsqueda; otra es la elevada diferencia de expresión en la superficie celular de los antígenos (incluso en poblaciones clonadas). La estrategia también depende de lo precisos que deban ser los resultados.

#### **1. 10. 1. INCREMENTO DE LA SEÑAL/RUIDO.**

Para conseguir lecturas precisas hay que procurar aumentar la razón entre la señal específica y el ruido de fondo que enmascara los resultados. Se describen a continuación diversos procedimientos para mejorar la lectura de los métodos inmunofluorescentes.

##### **1. 10. 1. 1. AUMENTO DE LA SEÑAL FLUORESCENTE.**

**a. Antisuecos:** es la mezcla de inmunoglobulinas que quedan en la sangre después de dejarla coagular; es por lo tanto una mezcla de anticuerpos heterólogos. Son necesarios antígenos puros para inmunizar y el suero necesita de repetidas purificaciones para que sea suficientemente específico. Tienen la ventaja frente a los anticuerpos monoclonales que son heterogéneos y pueden reconocer diferentes partes de la molécula del antígeno, y el resultado final es que producen una señal fuerte de fluorescencia.

**b. Anticuerpos monoclonales:** puestos a punto mediante la tecnología de los hibridomas en los que células inmunocompetentes contra antígenos conocidos se fusionan con células mielomatosas. Los clones resultantes producen cantidades de anticuerpo monoclonal que puede ser purificada y obtenido indefinidamente. La

ventaja es que no se necesita de antígenos puros para inmunizar puesto que se seleccionan células determinadas y el anticuerpo es muy específico (se elige el mejor, más específico, más fácil de conjugar con el fluorocromo, etc.).

**c. Tinción inmunofluorescente:** se pueden usar técnicas directas (poco background pero fluorescencia débil) o indirectas (aumenta el background pero aumenta la fluorescencia por amplificación de la unión). Para reducir el marcaje inespecífico por receptores Fc se pueden emplear fragmentos F(ab')<sub>2</sub> o la técnica de la streptavidina-biotina.

**d. Selección del fluorocromo:** el espectro de absorción del fluorocromo debe ser cercano al espectro de emisión de la fuente de luz; el coeficiente de extinción (probabilidad de absorber la luz) debe ser alto (PE >> FITC), recordar que puede ser modificado al unir el fluorocromo al anticuerpo; el rendimiento cuántico (probabilidad de emitir fotones al absorber luz) debe ser alto (PE > FITC), y el espectro de emisión debe ser diferente al de absorción para separar la señal, y diferente del segundo fluorocromo si se desea hacer doble marcaje. Es importante el tamaño del conjugado, sobre todo con la ficoeritrina, puesto que puede hacer insoluble al complejo PE-AcMo, y también es importante el número de moléculas unidas al anticuerpo, porque si aumenta, aumenta la fluorescencia, hasta que por proximidad se produce artefactuación de la emisión o del espectro.

Varios fluorocromos se han usado mayoritariamente en citometría:

- Fluoresceína (FITC): se excita bien a 488 nm, su rendimiento cuántico es de 0,5.
- Tetrametilrodamina y derivados: está siendo reemplazado por la ficoeritrina ya que no se excita bien con láseres iónicos.
- Ficoeritrina (PE): hay dos tipos: B y R. Mejor la R que la B porque se excita mejor a 488 nm. Ideal para el doble marcaje con fluoresceína. Es de difícil conjugación con los anticuerpos.
- Otros: PerCP, Cy5, y otros, como: Texas red con un pico de absorción a 596 nm, y alofocianina que absorbe a 650 y emite a 660: para triple y cuádruple marcaje con varios láseres.

## 1. 10. 1. 2. DISMINUCIÓN DEL BACKGROUND Y RUIDO.

El factor limitante de las técnicas de inmunofluorescencia no suele radicar en el equipo sino en la muestra: marcaje inespecífico y autofluorescencia.

**Background (marcaje inespecífico):** se puede reducir utilizando sólo la parte  $F(ab')_2$  de los anticuerpos, evitar células muertas que captan al anticuerpo de modo inespecífico (o discriminar con yoduro de propidio); procesamiento de controles negativos y selección de señal inespecífica, corrección informática de solapamiento espectral en doble marcaje. Hay que tener en cuenta el proceso de transferencia de energía cuando se marca con dos fluorocromos (muy cercanos en el espacio).

**Autofluorescencia:** la cantidad de autofluorescencia depende del tipo celular y de su estado de activación, y se atribuye a las flavinas y otras coenzimas. Depende también de la longitud de onda del láser (disminuye al aumentar la longitud de onda). También hay que eliminar el ruido producido por el aparato con filtros ópticos eficientes y compensación de color.

**Otras técnicas para aumentar la señal/ruido:** aumentar la frecuencia relativa de las células deseadas en una población heterogénea mejora su discriminación del restante de células: ello se puede conseguir purificando las células antes de su procesamiento por citometría (lisis de los hematíes centrifugación, etc.) o bien con análisis multiparamétrico (emplear dispersión frontal y lateral de luz para diferenciar a los linfocitos, la resistencia eléctrica para discriminar en función de tamaño, yoduro de propidio para eliminar las células muertas, etc.).

**Almacenamiento de las muestras:** las partículas o células deben ser analizadas inmediatamente después del marcaje inmunofenotípico o deben ser fijadas. Las células vivas se deben guardar en medios de cultivo y con un 0,1 % de NaH<sub>3</sub> en hielo (4 grados) para evitar cambios en las condiciones biológicas. Si se puede (no se precisa viabilidad celular) las células se pueden fijar en un 1 % de paraformaldehído en PBS y guardar a 4 grados en oscuro, con lo que no disminuye la fluorescencia ni cambian las características de dispersión de la luz y se puede demorar la lectura varios días.

## **1. 11. ESTUDIO CITOMÉTRICO EN EL ANÁLISIS DE LINFOCITOS B.**

### **1. 11. 1. LINFOPOYESIS DEL LINFOCITOS B**

Los linfocitos B derivan también de una célula germinal linfoide pluripotente y adquieren su competencia inmunológica, en el hombre, en la médula ósea y otros equivalentes de la bursa de Fabricio de las aves, como el hígado fetal, y posiblemente, la placenta.

Antes de llegar al estadio de célula pre-B, los precursores más inmaduros de célula B, denominados linfocitos pre-pre-B, pueden ser identificadas fenotípicamente mediante anticuerpos monoclonales. Estas células expresan antígeno HLA-DR y son positivas a los antígenos CD 19, CD 24, CD 10, así como a la enzima TdT. No poseen Igs, pero sí reordenamiento genético respecto del patrón de la línea germinal. El linfocito pre-B presenta todavía TdT y el antígeno Cd 10. Además expresa los antígenos HLA-DR, CD 19, CD 24 y aparecen los CD20 y CD 22. En cuanto a la expresión de las Inmunoglobulinas, este estadio es el primero en el que se pueden identificar cadenas pesadas m en el interior del citoplasma en ausencia de cadenas ligeras y de Ig de membrana. A medida que la maduración progresa, se pierde el CD 10, se reordenan los genes de las cadenas ligeras que se transcriben y se sintetiza y ensamblan. La célula pasa a expresar Ig M de superficie, denominándose linfocito B inmaduro. Poco después, pasa a linfocito B maduro que sintetiza también Ig D y sigue expresando los antígenos de membrana CD 19 y CD 24. También son positivos para el CD 20, CD 22 y CD 21. El CD 21 reconoce un epitopo del receptor del complemento CR 2, que a su vez constituye el receptor para el virus de Epstein-Barr.

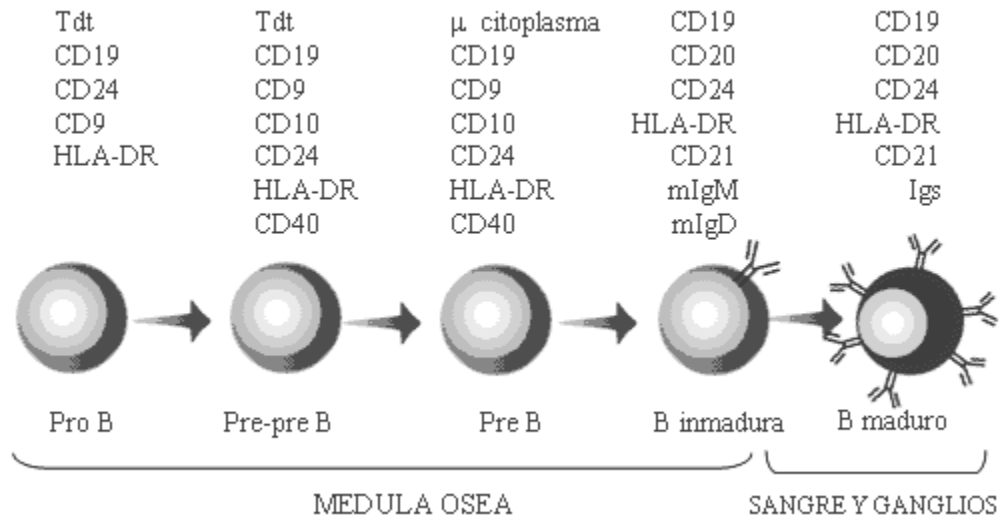


Imagen 7: representación esquemática del proceso de maduración de los linfocitos B con indicación de los marcadores de diferenciación presentes en cada etapa madurativa.

Los linfocitos maduros pasan de la médula ósea a la sangre periférica y se dirigen a los órganos linfáticos periféricos para ubicarse en los folículos linfoides. Aquí bajo un estímulo antigénico adecuado, se activan y proliferan formando el centro germinal en el interior del folículo linfoide. Los linfocitos B constituyen la minoría del pool linfocitario circulante (10%-20%), afincándose en los órganos linfáticos periféricos en las zonas B-dependientes.<sup>9</sup>

El linfocito sin memoria inmunológica de la sangre periférica procede directamente de la stem-cell, y que bajo un estímulo antigénico adecuado podría transformarse en las células centrolinfoculares, haciéndose, hoy en día, sinónimo para muchos autores el término de centroblasto pequeño y el de linfoblasto. Más comprometida resulta la ubicación del prolinfocito. El prolinfocito posee un fenotipo de membrana diferente al linfocito de la leucemia linfática crónica B. La inmunoglobulina de superficie se halla en alta concentración, lo que origina una intensa fluorescencia. Igualmente con relativa frecuencia se detecta en su interior inmunoglobulina citoplasmática, careciendo prácticamente de capacidad para formar rosetas M. Todo ello sugiere que el prolinfocito representa un estadio madurativo más avanzado que el linfocito B, aunque el término de prolinfocito hiciera pensar que se trata de una célula precursora. Con todo, la mayoría de autores lo ubican fuera del folículo linfoide, muy próximo en su evolución ontogénica al tricoleucocito. La

participación del prolinfocito en diversas entidades que parten de zonas externas al folículo linfoide como la leucemia linfática crónica y la tricoleucemia (tricoleucemia variante), parecen favorecer tal hipótesis.<sup>9</sup>

El linfocito B activado incrementa la expresión de las inmunoglobulinas de superficie y de algunos antígenos de membrana, como el HLA-DR, CD 19 y CD 20, mientras que otros disminuyen o desaparecen como el CD 24, CD 22 y CD 21. En este momento de activación y proliferación, aparecen en la membrana nuevas moléculas que no se detectan en el estado de reposo, como son el CD 23, el receptor para la transferrina y el receptor para la interleucina 2 o CD 25, y en ocasiones el CD 10. En este estadio el linfocito B pierde la Ig D, disminuye la intensidad de la expresión de la Ig M y además, puede expresar Ig G o Ig A.

Las células hendidas han recibido numerosas denominaciones: cleaved cells, germinocitos, células linfoides pequeñas y centrocitos en la clasificación de Kiel. Se caracterizan por poseer un citoplasma muy escaso e hialino en la variedad pequeña, y algo más extenso, con discreta insinuación de su basofilia, en la variedad grande. El núcleo tiene una cromatina condensada, sin nucleolos visibles a nivel óptico, en la variedad pequeña y con nucleolos visibles en la forma grande, semejando una célula blástica. Ambas subvariedades ofrecen como rasgo característico una hendidura, única o múltiple, que sólo puede iniciarse o llegar a ser tan profunda que segmente al núcleo. A veces, la incisuración es doble y simétrica, confiriéndole un aspecto riederiforme. Citoquímicamente las células hendidas se caracterizan por ser fosfatasa ácida negativas, beta-glucuronidasa negativas o sólo débilmente positivas.

Las células centrofoliculares no hendidas han sido denominadas: non cleaved cells, germinoblastos, células linfoides grandes, células centrofoliculares grandes y centroblastos por el grupo de Kiel. Morfológicamente son de tamaño superior a las células hendidas de gran tamaño; el núcleo es redondeado, de cromatina laxa y nucleolada. El citoplasma, moderadamente amplio, destaca por su notable pironinofilia. A medida que progresa en su estimulación aumenta de tamaño (células no hendidas grandes) hasta llegar a ser, en ocasiones, cuatro veces mayor que el linfocito normal en estado quiescente. Paralelamente al crecimiento nuclear aumenta

el grado de basofilia citoplasmática, así como la inmadurez nuclear, observándose múltiples nucleolos apuestos frecuentemente a la membrana nuclear. Citoquímicamente las células no hendidas están dotadas de escasa actividad de hidrolasa ácida. Es de destacar su gran actividad mitótica, a diferencia de las células hendidas.

Los linfocitos B que han seguido el proceso de estimulación y transformación en el centro del folículo linfoide hasta el estadio de células no hendidas de gran tamaño, salen del centro del folículo y se sitúan en los cordones medulares, donde siguen aumentando de tamaño hasta transformarse en inmunoblastos, también denominados grandes células pironinófilas. Los inmunoblastos pueden seguir el proceso de estimulación hasta las células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, en cuyo caso expresan el CD 23, o bien regresar al estado quiescente del pequeño linfocito B con memoria inmunológica, con expresión de CD 40 y demás características fenotípicas indistinguibles del linfocito B maduro, aunque en su membrana ya no expresarán Ig D sino Ig G o Ig M e Ig G o Ig A y poseen actividad de ATPasa y de 5' nucleotidasa. Estos linfocitos pasan a integrarse al reservorio de linfocitos B recirculantes del manto o corona. El inmunoblasto es una célula de gran tamaño (20-30  $\mu\text{m}$ ) con un amplio núcleo central. En ocasiones el núcleo adopta una posición algo excéntrica indicativa de una cierta diferenciación plasmocitoide. La cromatina nuclear es extremadamente laxa, con numerosos nucleolos que no suelen estar en contacto con la membrana nuclear. El citoplasma, moderadamente extenso, se caracteriza por su intensa basofilia y pironinofilia (gran célula pironinófila). Citoquímicamente los inmunoblastos denotan escasa actividad de hidrolasas ácidas.

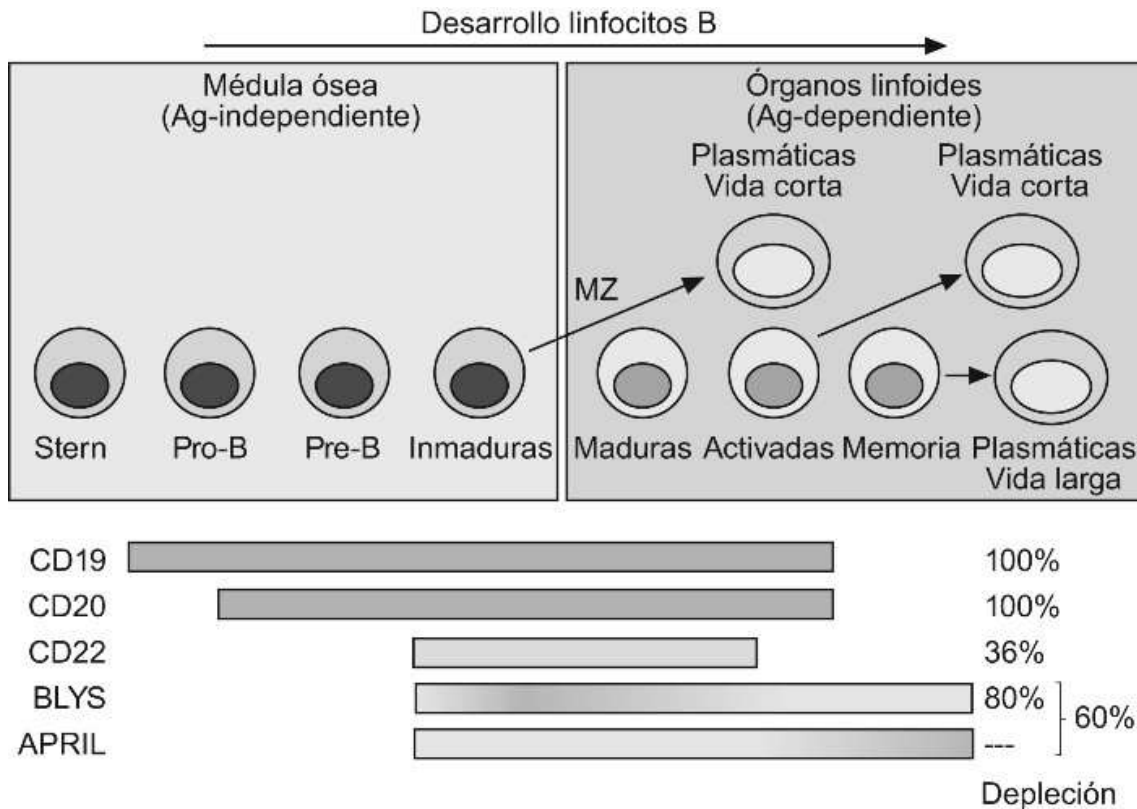
Las células plasmáticas, secretoras de inmunoglobulinas, representan el estadio final de la transformación antigénica del pequeño linfocito B. En este estadio las inmunoglobulinas (Ig), en lugar de expresarse en la membrana, pasan a ser secretadas y pueden ser fácilmente detectadas en el citoplasma. La célula plasmática expresa el CD 38 y se localizan en los cordones medulares de los ganglios linfáticos, bazo, timo, médula ósea, piel e intestino. En procesos reactivos pueden pasar a la sangre periférica. La célula plasmática tiene un tamaño de 12 a 15  $\mu\text{m}$ , y forma ovalada. El

núcleo, casi siempre excéntrico, posee una cromatina condensada en fuertes cúmulos cuya disposición radial adopta el aspecto morfológico "en rueda de carro"; el eje mayor del núcleo forma un ángulo recto con el eje mayor de la célula, lo cual es muy característico. El citoplasma es abundante e intensamente basófilo en toda su extensión, excepto en la zona centrosómica de la célula donde adquiere una tonalidad blanquecina (arcomplasma de configuración semilunar y situación paranuclear). Está desprovisto de granulación, pudiendo contener algunas vacuolas o bien cuerpos de Russell, que son inclusiones de 2 o 3  $\mu\text{m}$ , de color rosa claro o incoloras, y que corresponden a inclusiones inmunoglobulínicas. La célula de Mott corresponde a una célula plasmática con gran cantidad de estas inclusiones, que la convierten en una especie de mórula. En ocasiones, las inclusiones inmunoglobulínicas adoptan una estructura cristalina. El citoplasma de la célula plasmática puede adoptar una coloración rojo-violácea, aspecto denominado "flameado", y que es debido a la presencia de gran cantidad de glicoproteínas acumuladas en los sacos ergastoplásmicos. La excentricidad del núcleo y la intensa basofilia citoplasmática permiten la fácil identificación de este tipo celular.

#### **1. 11. 2. THE FREIBURG, PARIS AND EUROCLASS CLASSIFICATIONS.**

Para cuantificar los linfocitos B totales se utiliza el marcador CD19. Por otro lado, en los linfocitos B activados se pierde la expresión de las moléculas CD21, CD22 y CD24, hay un incremento en la expresión de moléculas HLA-DR y de receptores de linfocinas (por ejemplo el receptor de la IL-2) y aparecen marcadores nuevos, como el CD23, ausente en linfocitos B en reposo.





Imágen 8: desarrollo del linfocito B a lo largo de la médula ósea y órganos linfoides. En la parte inferior se pueden observar los marcadores de superficie que podemos encontrar en cada una de las subpoblaciones expresadas; necesarios para distinguir en el citómetro cada una de estas subpoblaciones (Imagen cedida por Dr. Iñaki Sanz).

La clasificación propuesta por los grupos científicos de Freiburg (Alemania) y París (the Freiburg, Paris and EUROClass Classifications) se basa en la cuantificación de las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria en sangre periférica, identificadas mediante citometría de flujo, utilizando como marcadores anticuerpos anti-IgD y CD27.<sup>10-12</sup> La molécula CD27 pertenece a la familia de los genes del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF). Se expresa en un subgrupo de linfocitos B en sangre y ganglios linfáticos y en la superficie de los linfocitos T circulantes.

En el curso del desarrollo del linfocito B virgen o *naive* (linfocito B IgD+, IgM+) que sale de médula ósea y sigue su proceso de maduración y diferenciación a célula plasmática, o linfocito B de memoria, en los tejidos secundarios, la mayoría de los linfocito pierda la expresión de IgD e IgM de su superficie.

En la sangre periférica humana, los linfocitos B que expresan CD27 (linfocitos CD 27+) se subdividen en al menos dos grupos: a) **Unswitched Memory**: células que mantienen la expresión de Ig D e Ig M (linfocitos CD27+ IgD+ IgM+) y b) **Switched Memory**: células que no (linfocitos CD27+IgM-IgD-). Los linfocitos B CD27+ IgD- IgM-

son los linfocitos de memoria funcionales; es decir, son las células B que efectuaron el cambio de isotipo y son capaces de producir inmunoglobulinas de todo tipo (IgG, IgA e IgE). Mientras que los linfocitos CD CD27+ IgD+ IgM+ corresponden a los linfocitos de memoria no funcionales, los que no han efectuado el cambio de isotipo y sintetizan únicamente la IgM.

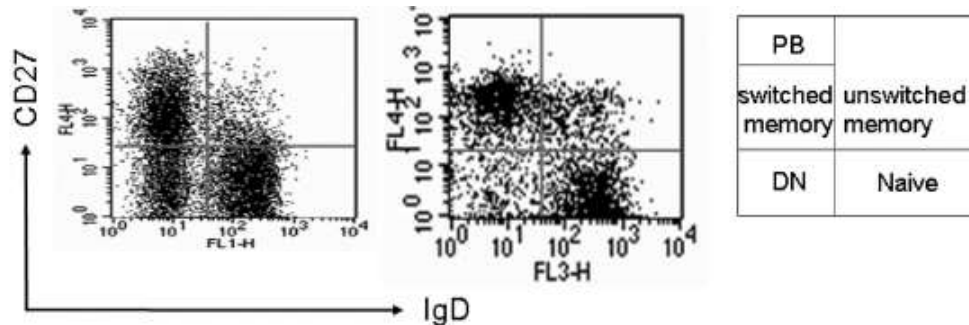


Imagen 9: Con los fluorocromos CD27, C19 e IgD podemos distinguir las siguientes subpoblaciones linfocitarias de la familia B: DN, unswitched memory, switched memory, PB, Naive. (Imagen cedida por Dr. I. Sanz).

Las células poco diferenciadas (pro-B) expresan el enzima Tdt. Los linfocitos B desde etapas de diferenciación tempranas expresan moléculas HLA de clase II que sólo existen además en células presentadoras de antígenos. También, en todas las etapas del proceso de diferenciación se expresa CD 19, que es el mejor marcador del linaje B.

En la tercera etapa madurativa (pre-B) se comienza a expresar la Inmunoglobulina en superficie, aunque sólo se completa en la última etapa de diferenciación (célula B inmadura), con la expresión de IgM e IgD en superficie. Es también en esta última etapa de diferenciación donde se aprecia la expresión de CD 20, que se pierde en el paso a células plasmáticas. Los linfocitos B inmaduros y maduros expresan CD21 que es a la vez receptor para complemento y para el virus de Epstein-Barr (EBV). Las moléculas CD19 y CD20 son importantes en la proliferación y activación de los linfocitos B. Por último, en los linfocitos B activados se enciende la expresión de la proteína CD38 (marcador de estado de activación que también tienen los linfocitos T activados). Otra molécula accesoria fundamental en los linfocitos B es CD40, puesto que cuando esta molécula se une a su ligando, da señales al linfocito B para que cambie de isotipo en su Inmunoglobulina.

### 1. 11. 3. CLASIFICACIÓN B MATURE (Bm).

Otra clasificación posible de las subpoblaciones tipo B viene definida por los fluorocromos IgD y CD38, en lo que se ha venido a llamar como clasificación **Bm (B mature)**.<sup>13</sup>

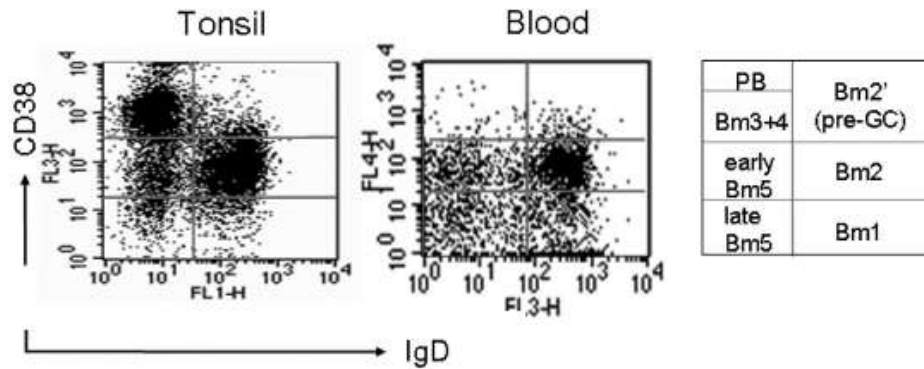


Imagen 10: con los fluorocromos CD38, C19 e IgD podemos distinguir las siguientes subpoblaciones linfocitarias de la familia B: Bm1, Bm2, Bm2' (preGC), PB, Bm3+4, early Bm5 y late Bm5 (Imagen cedida por el Dr. I. Sanz).

En base al uso de estos marcadores de superficie (IgD y CD38) se han encontrado 7 subpoblaciones de linfocitos B maduros (Bm). Bm1 virgen (IgD+ CD38-) que una vez activado como Bm2 (IgD+ CD38+) se diferencia en el centro germinal a Bm2' (IgD+ CD38++), en centroblastos Bm3 y centrocitocitos Bm4 (IgD- CD38++) y termina como Bm5 temprano (IgD- CD38+) y Bm5 tardío (IgD- CD38-), como por ejemplo los linfocitos B de memoria que expresan CD27 y células plasmáticas que no lo expresan.<sup>14</sup> A lo largo de la evolución de Bm1 a Bm5, cierto número de células de cada subtipo salen a la sangre periférica. La distribución de estas células está sesgada en pacientes con autoinmunidad.<sup>15</sup>

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

---

### 2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Los resultados en el estudio de *subpoblaciones linfocitarias tipo B*, obtenidos por citometría de flujo según los distintos procesamientos de muestra (en sangre periférica), se correlacionan con los obtenidos en la prueba Gold Standard (procesamiento de la muestra a las pocas horas de su extracción).

### 2.2. OBJETIVOS.

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Demostrar que los resultados finales en el estudio por citometría de flujo de las subpoblaciones linfocitarias tipo B, son similares en estos 4 procedimientos de muestra (sangre periférica) empleados.

#### **OBJETIVOS SECUNDARIOS.**

Conocer qué métodos de procesamiento de muestras (sangre periférica) son los que originan resultados más fiables de cara a la evaluación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B obtenidas por citometría de flujo.

Se realizará una citometría inicial con marcaje específico para células B, realizada a los pocos minutos de la extracción sanguínea; siendo este procesamiento el “*Gold Standard*” de nuestro estudio, dado que de este modo, la muestra no sufre alteraciones en su estructura celular ni en la superficie. Después, se compararán con esta prueba basal, los resultados obtenidos con el resto de procesamientos (un total de 3) y así determinar si existe variación estadísticamente significativa en los resultados finales.

Se pretende conocer cuáles son las subpoblaciones linfocitarias tipo B que más se ven afectadas en cada uno de los procesamientos de muestra.

A su vez, dado que este estudio se realizará sobre población sana, se determinará la media/mediana de las distintas subpoblaciones de linfocitos B según los dos clasificaciones utilizadas: (1) **THE FREIBURG, PARIS AND EUROCLASS CLASSIFICATIONS**: DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory; (2) **Clasificación B mature**: Bm1, Bm2, Bm2', Bm3y4, Early Bm5 y Late Bm5.

Por otra parte, dado que los marcadores de superficie son fluorocromos y su utilidad viene dada debido a que emiten una intensidad de señal luminosa, en un estudio paralelo se intenta evaluar la medias/medianas de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los fluorocromos utilizados para el estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B (CD19, CD38, IgD, CD3 y CD19) y, de este modo, conocer las diferencias obtenidas de acuerdo con el procesamiento de muestra utilizado. De igual modo, se intentará conocer qué procesamiento de muestra es el que produce mayor alteración en la señal de intensidad lumínica de cada uno de los fluorocromos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

---

### 3. 1. MATERIALES UTILIZADOS.

#### 3. 1. 1. SOLUCIÓN LISANTE BD FACS (CONCENTRADA 10X).

##### 3. 1. 1. 1. USO PROPUESTO.

La solución lisante FACS de BD se usa en la lisis de glóbulos rojos después de la tinción de inmunofluorescencia directa de las células de sangre humana periférica con anticuerpos monoclonales que se realiza antes del análisis por citometría de flujo.

La solución lisante FACS es adecuada para utilizarse con reactivos tales como TriTEST o Simultest, ambos de BD®, y un citómetro de flujo con equipo adecuado. Se puede utilizar en los procedimientos de lisis con o sin lavado.

##### 3. 1. 1. 2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN.

La detección eficiente de linfocitos en sangre periférica depende de la eliminación de las células que puedan interferir. La lisis de la sangre entera ha demostrado ser tan eficaz como la separación por gradiente de densidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para el análisis de subpoblaciones de linfocitos.<sup>9,16-18</sup> En los laboratorios clínicos, los métodos de lisis de sangre entera han reemplazado esencialmente la separación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque debido al menor tiempo que se necesita para preparar la muestra y la menor manipulación de la sangre entera.<sup>2</sup> Los estudios también han demostrado que con el método de lisis de la sangre entera es menos probable que haya pérdida de subpoblaciones de linfocitos, lo cual puede ayudar a mejorar la reproducibilidad del ensayo cuando se compara con los primeros métodos.<sup>2,3,19</sup>

##### 3. 1. 1. 3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.

Cuando se agrega sangre entera al reactivo de anticuerpos monoclonales, los anticuerpos conjugados con fluorocromos del reactivo se unen de forma específica a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Las muestras teñidas se tratan

entonces con la solución lisante FACS para producir la lisis de los glóbulos rojos en condiciones hipotónicas suaves al mismo tiempo que se conservan los leucocitos.

#### **3. 1. 1. 4. REACTIVO.**

##### **3. 1. 1. 4. 1. REACTIVO SUMINISTRADO.**

La solución lisante FACS concentrada 10X se presenta como 100mL de una solución tamponada, que está patentada, y que contiene <15% de formaldehído y <50% de dietilenglicol. Esta cantidad es suficiente para 2.000 pruebas cuando se utiliza en los procedimientos de lisado/no lavado de BD (por ejemplo TriTEST) y para 500 pruebas en los procedimientos lisado/lavado (por ejemplo, Simultest).

##### **3. 1. 1. 4. 2. PREOCUPACIONES.**

El reactivo contiene dietilenglicol y formaldehído. El formaldehído es dañino si se inhala, entra en contacto con la piel o se ingiere. Irrita los ojos y la piel. La exposición puede causar cáncer. Existen riesgos posibles de efectos irreversibles. El contacto con la piel puede causar sensibilización. Se debe almacenar bajo llave y fuera de alcance de los niños. Se debe mantener alejado de alimentos, bebidas y alimentos para animales. Se debe usar ropa y guantes de protección apropiados. El dietilenglicol, aún en cantidades pequeñas, puede ser fatal.

Todos los especímenes de sujetos así como los materiales con los que entran en contacto se consideran riesgos biológicos y se deben manipular como si fueran capaces de transmitir infecciones.<sup>20,21</sup>

##### **3. 1. 1. 4. 3. INSTRUCCIONES PARA DILUIR.**

Para conseguir la dilución 1X, se diluye la concentración 10X, al 1:10 con agua desionizada a temperatura ambiente (20º a 25ºC). La solución que se obtiene es estable durante un mes cuando se almacena en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.

### 3. 1. 1. 5. INSTRUMENTO.

La solución lisante FACS está diseñado para citómetros de flujo que tengan el sistema informático y el software adecuados. Los citómetros de flujo deben poder detectar la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de la luz.

### 3. 1. 1. 6. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Extraer la muestra asépticamente por punción venosa<sup>22,23</sup> en un tubo estéril VACUTAINER® de recolección de sangre con K3 EDTA (tapa color lila). Se deben seguir las instrucciones del fabricante sobre la cantidad mínima de sangre que debe ser conseguida. Almacenar la sangre anticoagulada a temperatura ambiente (20º a 25ºC) hasta que esté lista para la tinción y la lisis. Consultar las instrucciones sobre restricciones de almacenamiento antes de la tinción en los folletos de instrucciones de los reactivos correspondientes.



### 3. 1. 1. 7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de sangre se tiñen siguiendo las instrucciones específicas de cada reactivo que aparecen en el folleto respectivo. Los glóbulos rojos se lisan siguiendo las instrucciones de utilización de la solución lisante FACS diluida (1X). Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento de debe llevar a cabo a temperatura ambiente (20º a 25ºC).

### 3. 1. 1. 8. LIMITACIONES.

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales de referencia para cada parámetro del reactivo que pueda ser afectado por la técnica de preparación o por la edad y el sexo del paciente. La raza del paciente también puede tener influencia,<sup>24</sup> sin embargo no hay suficientes datos para asegurarlo. Cuando se establece un rango de referencia se deben conocer el sexo, la edad, las características clínicas y la raza de las personas.



La solución lisante FACS está diseñada específicamente para usarse con los citómetros de flujo de la marca FACS de BD.

EDTA es el anticoagulante de elección.

La lisis puede ser incompleta en las muestras que contienen glóbulos rojos nucleados ya que la solución lisante FACS no los lisa. Esto también puede ocurrir cuando se analizan muestras de pacientes con ciertos trastornos hematológicos en los cuales los glóbulos rojos son difíciles de lisar como pueden ser la mielofibrosis, la anemia de células falciformes, la talasemia y la esferocitosis.<sup>19</sup>

Cuando se utilizan reactivos monoclonales que reaccionan con las inmunoglobulinas del suero, las muestras de sangre se deben lavar antes de la tinción y la lisis con una solución salina tamponada con fosfato 1X o suero fisiológico.<sup>25</sup>

Un anticuerpo monoclonal frente a un antígeno de superficie de la célula que está: a) liberado en el plasma (por ejemplo, el receptor IL-2) o b) ocupado por componentes plasmáticos (por ejemplo, receptores de complemento) puede dar una intensidad de tinción reducida cuando el análisis se hace con métodos que utilizan sangre entera lisada.

### **3. 1. 1. 9. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.**

#### **3. 1. 1. 9. 1. PRECISIÓN.**

Se obtuvieron muestras de 17 donantes normales y 61 con anormalidades en dos centros clínicos para procesarlas con el reactivo TriTEST (CD3/CD4/CD45). Tres alícuotas de cada muestra se tiñeron, lisaron y analizaron en citómetros de flujo FACScan.

Sujetos	Subpoblaciones de linfocitos	N	Media	DS	GL
Normales	%CD3+	17	72	0,72	34
	%CD3+CD4+	17	42	0,79	34
Con anormalidades	%CD3+	61	77	0,88	122
	%CD3+CD4+	61	19	0,61	122

GL: grados de libertad: el número de observaciones, menos el número de medias, multiplicado por el número de sujetos (n).

En otro centro clínico se evaluó la reproducibilidad intra-muestra del reactivo Simultest (CD3/CD4). Las determinaciones se hicieron en muestras de sangres de seis sujetos normales y cuatro pacientes (VIH y trasplante renal). Se prepararon dos alícuotas de la misma muestra de sangre con el panel de reactivos Simultest IMK para linfocitos y cada alícuota se analizó dos veces en el mismo citómetro de flujo FACScan.

Sujetos	Subpoblaciones de linfocitos	N	Media	DS	GL
Normales	%CD3+	6	73	0,85	12
	%CD3+CD4+	6	46	1,08	12
Con anormalidades	%CD3+	4	83	0,77	8
	%CD3+CD4+	4	32	1,06	8

GL: grados de libertad: el número de observaciones, menos el número de medias, multiplicado por el número de sujetos (n).

### 3. 1. 1. 9.2. RECUPERACION DE GLÓBULOS BLANCOS.

Cinco muestras de sangre se trataron con la solución lisante FACS, se lavaron y analizaron para evaluar la recuperación de glóbulos blancos usando el analizador hematológico clínico ELT-1500™®. Cuando se comparó con el recuento total de glóbulos blancos, el promedio de recuperación después de utilizar la solución lisante fue del 92%.

### 3. 1. 1. 9.3. LISIS DE LOS GLÓBULOS ROJOS.

Cinco muestras de sangre se trataron con la solución lisante FACS, se lavaron y analizaron para evaluar la presencia de glóbulos rojos residuales usando el analizador hematológico clínico ELT-1500™. No se detectaron glóbulos rojos residuales.

### 3. 1. 2. FIJADOR: FORMALDEHÍDO AL 5%.

#### 3. 1. 2. 1. PROPIEDADES QUÍMICAS.

El formaldehído, HCHO, también conocido como formalina, formol, aldehído fórmico, metanal, es el primer miembro de las series de los aldehídos alifáticos. Es uno de los químicos orgánicos más importantes utilizado hoy en día en una gran cantidad de actividades y aplicaciones, sobre todo para la fijación de muestras (ver imagen 11).

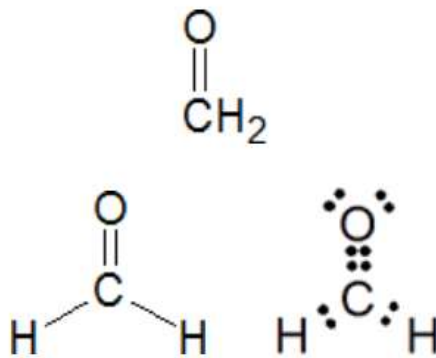


Imagen 11: estructura bioquímica de formaldehído.

A la temperatura ordinaria el formaldehído es un gas incoloro, inflamable, de olor muy irritante. Es soluble en el agua y los disolventes orgánicos usuales, pero insoluble en el éter de petróleo.

En la práctica, este compuesto se suministra bajo la forma de soluciones acuosas a concentraciones diversas (37-50% en peso). Son líquidos incoloros, de olor picante, miscibles con agua. Contienen alcohol metílico (hasta un 15 %) y trazas de ácido fórmico y ácido acético.

Algunas de sus características, son:

- Peso molecular 30.03
- Punto de fusión  $-92^{\circ}\text{C}$
- Punto de ebullición (760 mm Hg)  $-19.5^{\circ}\text{C}$
- Densidad ( $20^{\circ}\text{C}$ )  $1.09\text{ (g/cm}^3\text{)}$
- Densidad de vapor 1.075
- Tensión de vapor
  - $88^{\circ}\text{C}$  10 mm
  - $70.6^{\circ}\text{C}$  40 mm
  - $57.3^{\circ}\text{C}$  100 mm
  - $33^{\circ}\text{C}$  400 mm
- Límite de explosividad (%vol) en aire
- Límite inferior 7%
- Límite superior 73%
- Temperatura de auto ignición  $300\text{-}430^{\circ}\text{C}$ .

Puesto que el formaldehído puro es un gas a las temperaturas ordinarias y no puede manejarse fácilmente en ese estado, se comercializa principalmente en forma de solución acuosa (por lo general con 37% de HCHO en peso) y del polímero sólido hidratado, para-formaldehído  $(\text{CH}_2\text{O})_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

El formaldehído es un compuesto extremadamente reactivo. Se polimeriza muy fácilmente, incluso en frío, dando polímeros insolubles que enturbian las soluciones acuosas. Para evitar este inconveniente se les añaden estabilizantes, particularmente alcohol metílico.

Los oxidantes reaccionan enérgicamente con el formol. La mayoría de las reacciones de oxidación conducen a la formación de ácido fórmico, y la oxidación completa da lugar a anhídrido carbónico y agua.

A pesar de su fuerte reactividad, es un compuesto relativamente estable. El calor no lo descompone sensiblemente más que por encima de  $300^{\circ}\text{C}$ , con formación de

óxido de carbono e hidrógeno. Esta descomposición está favorecida por ciertos catalizadores

### **3. 1. 2. 1. 1. SOLUCIÓN DE FORMALDEHÍDO**

Las propiedades del formaldehído acuoso dependen de que en el estado disuelto esté polimerizado e hidratado. Puesto que suele manejarse como solución la composición y las propiedades del sistema formaldehído-agua tiene especial importancia. El formaldehído disuelto es esencialmente una mezcla en equilibrio. Sin embargo, el espectro de absorción ultravioleta indica que hay pequeñas cantidades del monómero no hidratado en algunas condiciones de temperatura y concentración.

Ese estado de equilibrio depende de la concentración y temperatura. En concentraciones del 2% o menos el formaldehído está prácticamente de glicol metilénico, en concentraciones mayores, la solución contiene proporciones crecientes de polímeros hidratados, y aumenta el grado de polimerización al aumentar la concentración del formaldehído disuelto.

La rapidez con que se alcanza el equilibrio, después de un cambio de temperatura o concentración, es pequeña a temperaturas bajas y exige más de dos días a 0°C.

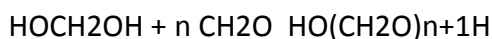
Las soluciones concentradas (más de 30% de HCHO) tienen que conservarse calientes si se quiere evitar la precipitación. Los alcoholes, como el metanol aumentan la estabilidad de la solución, por la formación de hemiacetales. La presión parcial del formaldehído en equilibrio con la solución es baja y es una función de la concentración del glicol de la concentración del glicol metilénico más que del contenido total del formaldehído.

Las moléculas de formaldehído están en un grado considerables asociadas al estado gaseoso y la presión parcial del gas puede considerarse como la presión de descomposición del hidrato disuelto. Estos factores explican el hecho de que las soluciones de formaldehído pueden concentrarse por evaporación al vacío a temperatura baja, mientras que la destilación a presión y temperatura elevada hace

posible obtener destilados concentrados partiendo de soluciones diluidas. Por destilación a presiones ordinarias sin rectificación, el residuo en el destilador está siempre algo más concentrado que la solución destilada. La condensación fraccionada de los vapores de solución en ebullición da como resultado un aumento de formaldehído en el vapor no condensado, ya que el agua es el componente menos volátil de la mezcla.

El formaldehído monomérico físicamente disuelto (CH<sub>2</sub>O) está solo presente en soluciones acuosas a concentraciones de hasta el 0,1% en peso.

Las soluciones de formaldehído en agua contienen formaldehído en la forma de glicoles (Oligómeros del metilenglicol) de acuerdo a la siguiente reacción de polimerización:



El formaldehído es sumamente activo y se combina químicamente con casi todos los tipos de compuestos orgánicos, con excepciones de las parafinas. Puede emplearse en forma de monómero anhídrido, solución o polímeros con resultados equivalentes.

Por reducción el formaldehído se convierte en metanol, la oxidación da ácido fórmico o gas carbónico. La reacción de Cannizzaro en solución acuosa da ácido fórmico y metanol en proporción equimolares:



Esta reacción es acelerada por los álcalis que explica el aumento gradual en la acidez de las soluciones comerciales en almacenamiento prolongado.

El formaldehído reacciona consigo mismo en condensación del tipo de aldol para dar los hidroxialdehídos inferiores, hidroxicetonas y hexosas. Esta reacción es autocatalítica y es favorecida por condiciones alcalinas.

El general, las principales reacciones químicas del formaldehído con otros compuestos implican la formación de derivados de metilol o metileno. Las

policondensaciones conducen a la formación de resinas de peso molecular elevado en las cuales las moléculas del otro reactivo están enlazadas por los grupos metilenos. Los catalizadores alcalinos favorecen la formación de derivados del metilol, mientras que los ácidos suelen favorecer la producción de metileno. Los derivados del metilol son probablemente los productos primarios de la reacción, pero en muchos casos son muy activos y sufren reacciones de condensación para formar derivados metilénicos incluso en condiciones alcalinas.

Con catalizadores ácidos, el formaldehído y los alcoholes, los glicoles y los compuestos alifáticos polihidroxilados reaccionan para dar formales (éteres de metileno), mientras que en condiciones neutras o alcalinas se producen hemiacetales inestables. El formaldehído reacciona con los halogenuros de hidrógeno y los alcoholes para dar éteres a-halométicos.

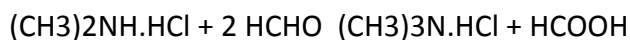
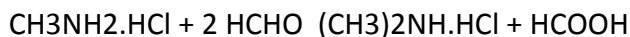
El fenol y muchos sustituidos forman compuestos del metilol (alcoholes fenólicos), que sufren una policondensación para dar resinas de fenol - formaldehído. El grupo metilol entra en las posiciones orto y para sobre el núcleo bencénico; si estas posiciones están bloqueadas no pueden producirse las condensaciones nucleares ordinarias.

Los catalizadores ácidos conducen a una policondensación inmediata y en general no permiten el aislamiento de los derivados del metilol sencillos, que es a menudo posible se emplea álcalis.

El amoníaco y las aminas se condensan fácilmente con el formaldehído para dar derivados de metilenos sencillos o cíclicos, pero las aminas terciarias no reaccionan.

La reacción de Mannich implica la condensación de amoníaco, una amina primaria o una amina secundaria, por lo general en forma de clorhidrato con formaldehído y un compuesto que posee uno o varios átomos activos de hidrógeno.

Cuando se calienta el formaldehído con aminas o sales de amonio en condiciones ácidas, se reducen los productos primarios de metilaminas:



Las amidas dan derivados de metilol relativamente estables en condiciones alcalinas. Las metilureas o ureas por condensación producen resinas de urea-formaldehído. La melamina reacciona de manera análoga a la urea y da derivados de polimetilol y resinas.

Los hidrocarburos no saturados y aromáticos reaccionan con el formaldehído en presencia de ácidos fuertes. La reacción con oleofinas suele dar como resultado la formación de 1,3-glicol o un alcohol no saturado en forma de éster o formal.

### **3. 1. 3. BUFFER FOSFATO SALINO. SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA POR FOSFATOS (PBS)**

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. Esta solución es empleada comúnmente para lavar células a través de centrifugación. El PBS puede ser empleado como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida. Esta monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación. Los amortiguadores a base de carbonatos también son empleados para este procedimiento, aunque con menor éxito. El PBS también es empleado como referencia espectral para



procedimientos de elipsometría por absorción proteica. El PBS puede ser complementado con aditivos para procedimientos específicos. La adición de EDTA, por ejemplo, permite disgregar células cuando estas forman agregados. La incorporación de Zinc, no obstante, no es recomendada ya que provoca la precipitación de otras sales constituyentes.

En el campo de la citometría, el PBS se usa frecuentemente para el mantenimiento celular in vitro de periodos breves, pero si esto es para un periodo más largo es conveniente que contenga alguna proteína (HBSS o HEPES) para el mantenimiento del pH durante varias horas.

### **3. 1. 4. SC ANTI-MOUSE COMPENSATION STANDARD.**

La validez de nuestras conclusiones depende de la pureza del resultado ya que el tiempo sólo depende de la eficiencia del sorting. Se producen más gotas vacías que con células y generalmente se sorteian tres gotas por evento activado. Para calcular el retardo se hacen pruebas hasta conseguir la mejor recuperación (mínimo del 95 %). Si se desea mirar también la pureza se usan bolas de dos colores (SC ANTI-MOUSE COMPENSATION STANDARD en nuestro caso) y se establece una ventana de sorter sobre unas de ellas. Cuando el número de células a sortear debe ser preciso se pueden mezclar bolas con la muestra y calcular el porcentaje de recuperación de ellas, sabiendo éste (que se cuenta durante la separación) se asume que es el mismo que para las células, y se calcula el número total de eventos a procesar para conseguir el número total de células deseadas.

La monitorización en tiempo real de la velocidad de adquisición puede proporcionar información continuada de que no hay problemas en el correcto funcionamiento del citómetro.

### 3. 1. 5. FACS CANTO II (OCHO COLORES).

El citómetro BD FACS Canto está equipado con 3 láseres (azul, de 488 nm, rojo, de 633 nm y violeta, de 405 nm) permitiendo analizar hasta 8 fluorescencias, por tanto, 10 parámetros. Es capaz de adquirir hasta 10.000 eventos por segundo, necesitando volúmenes menores de muestras y con una sensibilidad tal capaz de resolver los eventos más débiles. Además el arrastre entre muestras (contaminaciones) es mínimo (<0,1%).



Imagen 12: fotografía del FACS Canto II de ocho colores utilizado para la realización de esta tesis doctoral.

### **3. 1. 6. REACTIVOS/FLUOROCROMOS UTILIZADOS. MARCADORES DE LINFOCITOS B PARA LA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN.**

#### **3. 1. 6. 1. INMUNOGLOBULINA D.**

##### **3. 1. 6. 1. 1. DESCRIPCIÓN GENERAL.**

La inmunoglobulina D (IgD) es, de las proteínas presentes en el suero humano, la menos conocida en cuanto a su función biológica. En la actualidad, se han incrementado los estudios de la IgD sérica en relación con diferentes enfermedades, al demostrarse su participación en determinados trastornos febriles en niños, así como el papel de esta en la respuesta inmune, dado por su expresión en la membrana de los *linfocitos B* formando parte del receptor antigénico.

Los estudios de la inmunoglobulina D (IgD) en suero se han extendido por más de 4 décadas sin que se haya podido establecer un papel específico, no así para la IgD unida a la membrana de linfocitos B, a la que se han propuesto diversas funciones.<sup>26</sup> El hallazgo de un aumento de IgD en pacientes con episodios periódicos de fiebre llevó a reiniciar investigaciones acerca de su posible función biológica.<sup>27</sup>

##### **3. 1. 6. 1. 1. 1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.**

La IgD humana representa aproximadamente el 0,25 % de las inmunoglobulinas totales del suero, con un PM de 185,000 y una vida media de 2,8 días, similar a la de la IgE. Su nivel de síntesis es 10 veces menor que el de la IgA, IgM, e IgG. El catabolismo de la IgD disminuye a altas concentraciones en suero. Inicialmente, se consideró que aproximadamente el 75 % de la IgD era intravascular, pero recientemente se demostró en 2 pacientes con mieloma IgD que sólo era intravascular el 31,5 %.<sup>28</sup>

La molécula de IgD tiene una larga región "bisagra" entre Fab y Fc, lo que proporciona a la molécula más susceptibilidad a la degradación proteolítica, así como una mayor flexibilidad que favorece la unión al antígeno, y presenta 3 dominios en la región constante.<sup>29</sup> En 1982 se reportó la secuencia aminoacídica en una IgD monoclonal, y en 1985 la secuencia genómica.<sup>30</sup>

Las cadenas pesadas de la IgD en la superficie de las células B están covalentemente unidas por un puente disulfuro cerca de la porción carboxi terminal. Esto permite un grado mayor de libertad de los sitios de unión al antígeno que en los otros isotipos de inmunoglobulinas.<sup>26</sup> La IgD sérica y la IgD unida a membrana son antigénicamente similares, pero difieren en su susceptibilidad a la proteólisis por plasmina. También, las cadenas de la IgD unidas a membrana, tienen una movilidad electroforética ligeramente más lenta que las cadenas monoclonales en suero, lo que hace pensar en un mayor peso molecular para la primera.<sup>29</sup>

### **3. 1. 6. 1. 1. 2. PAPEL EN LA RESPUESTA INMUNE.**

En 1972, se descubrió la IgD en la superficie de células de B, en humanos y otras especies, formando parte del receptor antigénico coexpresado con IgM. Se ha demostrado la presencia de células en tejido linfoide que expresan solamente IgD en su superficie, las glándulas adenoideas comprenden un número mayor de células plasmáticas que contienen IgD que el bazo, nódulos linfáticos o el tejido linfoide intestinal.<sup>31</sup> Se ha demostrado en cultivos de linfocitos de amígdalas la síntesis espontánea y secreción de IgD.<sup>32</sup> Agregados de IgD monoclonal activan la vía alternativa del complemento.<sup>33</sup>

Las señales transducidas por los receptores de IgM o IgD en linfocitos B son las mismas, pero con cinéticas diferentes. Señales transmitidas a través de la IgD de superficie causaron la inducción de 80 mutaciones somáticas diferentes.<sup>1</sup> La llamada paradoja de IgD es la asociación preferencial entre las cadenas pesadas y ligeras en las células secretoras de IgD. Explicaciones dadas para esta asociación preferencial señalan que las restricciones físicas favorecen la misma durante el ensamblaje intracelular de las cadenas, la respuesta inmune de IgD es muy restringida, hay un alto grado de selectividad y regulación poco ortodoxa de la expresión de cadenas ligeras de la IgD.<sup>34</sup>

La síntesis de IgD está influenciada por 2 factores: un mecanismo independiente que puede estar genéticamente determinado, o también por los mismos factores que controlan la producción de otros isotipos de inmunoglobulinas.<sup>35</sup>

Los genes para la región constante C de  $\mu$  y d ( $C\mu$  y  $Cd$ ) son transcritos en el mismo ARN y pueden expresarse simultáneamente. Las moléculas de IgM e IgD presentes en células B individuales tienen sitios de unión con el antígeno idénticos, y son coexpresadas mediante empalme diferencial de un exón de VDJ común a los exones  $C\mu$  o  $Cd$  para producir ARN  $\mu$  y d. Existe exclusión alélica para la IgD, al igual que para las otras clases de inmunoglobulinas. Después que el antígeno se une con el receptor de células B, las células se transforman en células plasmáticas que no tienen IgD, excepto para aquellas secretoras de IgD, donde el gen  $\mu$  está delecionado o de células de memoria en órganos linfoides secundarios, donde la expresión de IgD se pierde.<sup>36</sup> Ambos receptores de IgD e IgM pueden transducir señales por el mismo mecanismo; sin embargo, las señales mediadas por la IgD de superficie difieren de aquellas mediadas por la IgM, ya que solo las emitidas por esta última, posibilitan el fenómeno de muerte programada o apoptosis.<sup>37</sup>

Del 10 al 15 % de las células T periféricas humanas, presentan receptores para IgD y forman rosetas con eritrocitos cubiertos con IgD. La expresión sobre las células T de estos receptores se incrementa mediante interleukina 2 (IL2), IL4 e interferón  $\gamma$ . Células T CD4+ y CD8+ pueden expresar receptores de IgD, que pueden unir IgD de membrana durante la presentación antigénica por células B para facilitar la respuesta de células T y B antígeno- específicas.<sup>38</sup>

La IgD sérica es considerada un marcador temprano de la activación de células B; puede tener un papel regulador, como por ejemplo estimular la respuesta protectora de anticuerpos de los isotipos IgM o IgA, o interferir con la replicación viral.<sup>39</sup> Participa en la generación y mantenimiento de las células B de memoria, y se le señala una participación importante en la transición de un estado de susceptibilidad a la inducción de tolerancia de células B a uno de respuesta. Es un potente inductor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), IL-1 y de su receptor; también induce la liberación de IL-6, IL-10.<sup>1</sup>

### **3. 1. 6. 1. 1. 3. NIVELES DE IgD SÉRICA EN DIVERSAS ENFERMEDADES.**

El significado de una concentración anormal de IgD en suero no está bien establecido. La IgD se midió en el suero de individuos con diversas condiciones patológicas, y los valores obtenidos probablemente dependieron de las técnicas empleadas para su medición; se realizó una comparación entre los resultados obtenidos en pacientes con varias enfermedades y los obtenidos por las mismas técnicas en individuos sanos, de ahí que las conclusiones fueron válidas.<sup>40</sup>

#### **3. 1. 6. 1. 1. 3. 1. INFECCIONES.**

Anticuerpos de la clase de IgD se comportan como los de la clase IgM en la fase temprana de la infección.<sup>41</sup> Se ha demostrado una significativa correlación positiva entre los niveles de IgD y los títulos de anticuerpos fijadores de complemento específicos contra el *Mycobacterium pneumoniae*. Anticuerpos de la clase IgD antirrubéola y antiviral del sarampión fueron encontrados en pacientes con rubéola y panencefalitis esclerosante subaguda.<sup>42</sup> También se han reportado anticuerpos IgD contra la toxina diftérica, *Escherichia coli*, y estreptolisina O.<sup>43</sup> La IgD se une de forma inespecífica con bacterias a través del fragmento Fc; por ejemplo, a *Neisseria catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*, y a los grupos A, C y G de *Streptococcus*.<sup>44</sup>

En las infecciones crónicas se ha demostrado un aumento en las concentraciones de IgD en suero, como por ejemplo en la lepra, tuberculosis, salmonellosis, las hepatitis infecciosas y malaria. En gran número de pacientes con niveles elevados de IgD se encontraron infecciones recurrentes por estafilococos.<sup>45 46</sup>

#### **3. 1. 6. 1. 1. 3. 2. INMUNODEFICIENCIAS.**

Los pacientes con inmunodeficiencias presentan diversas infecciones frecuentemente. No existe un patrón definido en la síntesis de IgD en las inmunodeficiencias primarias; algunos individuos tienen niveles aumentados y otros disminuidos.<sup>35</sup> Dentro del grupo de inmunodeficiencias, se ha demostrado una correlación positiva de IgD con IgA e IgE. Una correlación positiva de los niveles de IgA e IgD se encontró en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia

humana. Se detectó un aumento de IgD en el suero del 49 % de pacientes con deficiencia de IgA y se encontraron numerosas células plasmáticas productoras de IgD en los lagrimales y glándulas parótidas, lo cual sugiere que la IgD secretora pudiera desempeñar un papel compensatorio en la deficiencia de IgA.<sup>46</sup> Algunos pacientes con síndrome hiper IgE, que a menudo presentan infecciones recurrentes con estafilococo, tienen niveles elevados de IgD en suero, aunque otros autores han reportado niveles bajos de IgD. Una disminución de IgD en plasma se demostró en pacientes con síndrome de Wiskcott-Aldrich.<sup>46</sup>

La IgD estaba aumentada en el plasma de pacientes con síndrome de Nezelof y en niños con ataxia telangiectasia.<sup>46,47</sup> En pacientes con alteraciones de la inmunidad mediada por células se encontraron niveles elevados de IgD como en la aspergillosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis y en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.<sup>48</sup>

Recientemente, se demostró en 131 niños con diferentes tipos de inmunodeficiencias, incluyendo deficiencias del ligando del CD40, que los niveles de IgD no estaban asociados con el cuadro general de activación inmune.<sup>35</sup>

### **3. 1. 6. 1. 1. 3. 3. ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y ALÉRGICAS.**

La IgD estaba aumentada en pacientes con enfermedades autoinmunes que tenían además un incremento de IgG, IgA, e IgM.<sup>49</sup> Se encontraron niveles altos de IgD en suero de pacientes adultos con artritis reumatoidea y en niños con artritis reumatoidea juvenil.<sup>50</sup> Anticuerpos antinucleares de la clase de IgD se demostraron en pacientes con lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, tiroiditis autoinmune y en la esclerodermia.<sup>51</sup> Se han demostrado autoanticuerpos de la clase IgD específicos contra la tiroglobulina y la insulina, en individuos con diabetes y contra el gluten en la enfermedad celíaca.<sup>52</sup>

Se ha reportado en enfermedades como la dermatitis atópica y el asma alérgica, un aumento o disminución de IgD.<sup>45</sup> En pacientes con asma se ha relacionado la degranulación de los basófilos con altas concentraciones de anti IgD.<sup>53</sup>

### 3. 1. 6. 1. 1. 3. 4. OTRAS CONDICIONES.

Las concentraciones promedio de IgD en suero en fumadores de cigarro fue el doble que los no fumadores. Los niveles de IgD se normalizaron al dejar de fumar. La razón del incremento de IgD en fumadores no se conoce; la causa pudiera deberse a las infecciones que ocurren en estos individuos debido a la influencia de las sustancias presentes en el humo del tabaco.<sup>54</sup>

Un aumento de IgD en suero se demostró en pacientes con la enfermedad de Hodgkin varios meses después de la esplenectomía.<sup>55</sup> Se encontró una correlación con el tipo histológico en pacientes depleccionados de linfocitos que tenían niveles extremadamente altos de IgD; pacientes en tratamiento tenían valores significativamente más bajos que los pacientes sin tratamiento.<sup>56</sup> Se observó una disminución de IgD en suero después de la radioterapia, pero no después de la quimioterapia en pacientes con linfoma.

En niños con Kwashiorkor se encontró una disminución de la concentración de IgD en suero, en pacientes con síndrome de Behcet, y en la vasculitis retinal idiopática.<sup>57</sup> La concentración promedio de IgD en suero en un grupo de niños con púrpura de Schoenlein- Henöch fue significativamente mayor que en el suero de niños sanos.<sup>58</sup> Los valores de IgD sérica fueron significativamente más elevados en pacientes con obstrucción pulmonar crónica que en individuos sanos.<sup>59</sup>

Valores elevados de IgD en suero se encontraron en pacientes con hiperparatiroidismo.<sup>40</sup> En un grupo de pacientes con tumores en el sistema nervioso central se encontró un aumento de los niveles de IgD en suero, así como bandas oligoclonales de IgD en fluido espinal, lo cual sugiere que la producción de IgD en estos pacientes ocurre independientemente que la de IgG.<sup>41</sup> Valores altos de IgD en suero fueron reportados en pacientes con aortitis y con cirrosis hepática.



### 3. 1. 6. 1. 1. 3. 5. IgD MONOCLONAL.

La medición de IgD en suero es más importante para el diagnóstico y monitoreo de gammapatías monoclonales malignas (mieloma IgD y enfermedades de cadenas pesadas).

El mieloma IgD representa alrededor del 1,2 % de los mielomas múltiples.<sup>60</sup> Tiene un curso agresivo con complicaciones extramedulares, amiloidosis, linfadenopatía, esplenomegalia, anemia severa, proteinuria de Bence Jones y una corta supervivencia.<sup>61</sup> El componente M que representa la IgD monoclonal, se observa en el 60 % de las electroforesis de proteínas de pacientes con mieloma IgD; el resto presenta patrones normales.<sup>62</sup>

Existe una variabilidad antigénica entre la IgD monoclonal probablemente debido a variantes alotípicas.<sup>63</sup> Se ha demostrado IgD monoclonal con actividad de anticuerpo contra triglicéridos en pacientes con hiperlipidemia, así como IgD monoclonal con actividad de piroglobulina.<sup>64</sup> Se han reportado pacientes con presencia de IgD monoclonal de significado indeterminado.<sup>65</sup>

### 3. 1. 6. 1. 2. CARACTERÍSTICAS DEL FLUOROCROMO (PE MOUSE ANTI-HUMAN Ig D).

Número de catálogo: 555779

Marca: BD Pharmingen™

Nombre: IgD

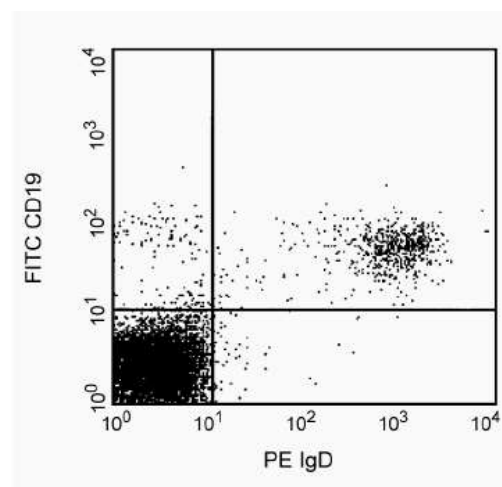
Tamaño: 100 test.

Status regulador: RUO

Clon: IA6-2

Formato: PE

Isotipo: IgG2a, κ



**Imagen 13:** imagen de células mononucleares de sangre periférica, estudiada por un citómetro tipo FACs Calibur (Ig D/CD19)

Tamaño molecular: ninguno.

Reactividad: humana.

Aplicaciones: test de citometría de flujo.

### **3. 1. 6. 2. CD 19.**

#### **3. 1. 6. 2. 1. DESCRIPCIÓN GENERAL.**

Las células dendríticas foliculares también expresan esta molécula. La CD19, junto con CD21, CD81, Leu13, y el CMH de clase II, forman un complejo multimolecular que se asocia con el BCR. El señalamiento a través de CD19 induce la fosforilación de la tirosina, el flujo de calcio y la proliferación de los linfocitos B.<sup>7</sup>

CD19 es una proteína codificada por un gen localizado en el cromosoma 16p11.2.<sup>19</sup> Tiene un peso de 95 kDa; se expresa en células de linaje B a excepción de las células plasmáticas<sup>66</sup>. CD19 forma parte del correceptor de los linfocitos B (LB) junto con CD21 y CD81 (TAPA-1). Este complejo es de vital importancia en la activación de los LB pues son capaces de transducir señales secundarias para la activación de estos por medio de la unión de CD21 a C3d, que recubre algunos antígenos (Ag) luego de la activación del complemento. CD19 cumple junto con CD21 y CD81 un papel importante en la activación de LB pues ayuda a la transducción de señales secundarias que disminuyen el umbral de activación gracias a la capacidad de CD19 para unirse a varias proteínas que participan en varias vías de señalización favoreciendo la activación de factores de transcripción.<sup>67</sup>

### 3. 1. 6. 2.2. CARACTERÍSTICAS DEL FLUOROCROMO (APC-Cy<sup>™</sup>7 Mouse Anti-Human CD19).

Número de catálogo: 557791

Marca: BD Pharmingen<sup>™</sup>

Nombre: CD19

Tamaño: 100 test

Status regulador: RUO

Clon: SJ25C1

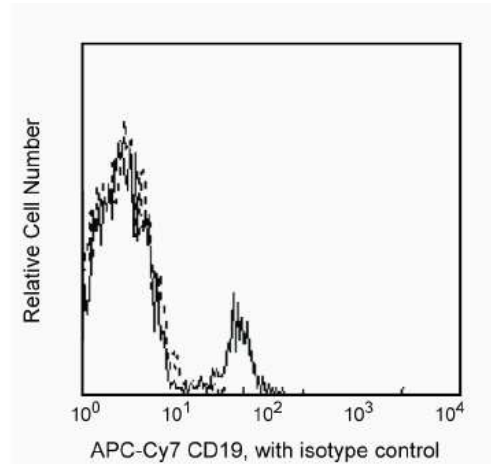
Formato: APC

Isotipo: Mouse IgG1, k

Tamaño molecular: ninguno.

Reactividad: humana.

Aplicaciones: test de citometría de flujo.



**Imagen 14:** Patrón de fluorescencia de linfocitos de sangre periférica humana normal teñidos con APC-Cy<sup>™</sup>7 Mouse Anti-Human CD19.

### 3. 1. 6. 3. CD 38.

#### 3. 1. 6. 3. 1. DESCRIPCIÓN GENERAL.

Se conoce que los linfocitos B, productores de los anticuerpos, no sólo reciben la información a través de su receptor para el antígeno (abreviado como BC-R), sino también de otras moléculas de la membrana celular, conocidas como correceptores. Una de estas moléculas correceptoras es el CD38.

Hasta hace algunos años se pensaba que el linfocito B que salía de la médula ósea ya estaba maduro, pero no es así; la célula sale inmadura de la médula ósea y completa su proceso de maduración en el bazo. A estas células que no están completamente maduras se les conoce como *transicionales* y se clasifican en 2 tipos: las células *transicionales 1*, que son aquellas recién llegadas al bazo, provenientes de la

médula ósea y las *transicionales 2*, que son la penúltima etapa de maduración del linfocito B y que se encuentran únicamente en el bazo.<sup>68</sup>

La molécula CD38 está presente durante casi todo el desarrollo de los linfocitos B y su expresión se modifica durante la maduración de éstos; así, la expresión aumenta en los linfocitos B transicionales 2 para disminuir nuevamente en las células maduras. Una prueba de la importancia de CD38 en la maduración de los linfocitos B se obtuvo del estudio de ratones deficientes en esta proteína, que mostraron un retraso en la maduración de los linfocitos B. También, las células transicionales 2, expresan casi 3 veces más CD38 que las transicionales 1 y la expresión de dicha molécula disminuye en las células maduras.<sup>69</sup>

Las células transicionales y maduras han sido purificadas por citometría de flujo (FACS), observándose que las células transicionales 1 no proliferan al estímulo con anti-CD38, mientras que las transicionales 2 lo hacen vigorosamente. Las células transicionales 1, no sólo no proliferan al estímulo con anti-CD38, sino que además mueren más rápidamente. También se ha estudiado su contenido en DNA, después de 12 y 24 horas de cultivo. En medio de cultivo, las células transicionales 1 mueren, y al estimularlas con anti-CD38, un mayor número de ellas entra en proceso de muerte celular programada, también conocido como apoptosis. El resultado es más dramático después de 24 horas de cultivo, donde alrededor de un 10 por ciento de linfocitos transicionales 1, cultivados únicamente en medio, se encuentran en apoptosis, en contraste con aquellas estimuladas a través del CD38, donde casi la mitad se encuentra en este proceso de muerte celular programada.<sup>70</sup>

Un linfocito B inmaduro, que reconoce un antígeno propio (autoantígeno) debe ser eliminado. No es conveniente que este linfocito llegue a madurar porque comenzaría a producir anticuerpos contra nuestro propio organismo. El encuentro de este linfocito (todavía inmaduro) con su antígeno, provoca su eliminación (muerte por apoptosis) o induce un estado de anergia (falta de respuesta). CD38 parece ayudar en este proceso, seleccionando negativamente a las células inmaduras y llevándolas a apoptosis. Así, el BCR y CD38 trabajan conjuntamente para promover una selección negativa más eficiente de células indeseables.<sup>71</sup>

En cuanto a la diferenciación de las células transicionales 2, al ser activadas con anti-CD38, se ha observado que a las 48 horas, prácticamente todos los linfocitos transicionales 2 se diferenciaron, en contraste con el medio de cultivo, donde prácticamente ninguna célula lo hizo. Por tanto, el anti-CD38 induce la maduración de los linfocitos B transicionales 2.<sup>72</sup>

Por tanto, CD38 se comunica y participa conjuntamente en la selección de las células transicionales 1 para llevarlas a apoptosis y en la selección de las transicionales 2 para llevarlas a proliferación y maduración.

### 3. 1. 6. 3. 2. CARACTERÍSTICAS DEL FLUOROCROMO (PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse Anti-Human CD38).

Número de catálogo: 551400

Marca: BD Pharmingen<sup>TM</sup>

Nombre: CD38

Tamaño: 100 test

Status regulador: RUO

Clon: HIT2

Formato: PerCP-Cy 5.5

Isotipo: Mouse IgG1, k

Tamaño molecular: ninguno.

Reactividad: humana.

Aplicaciones: test de citometría de flujo.

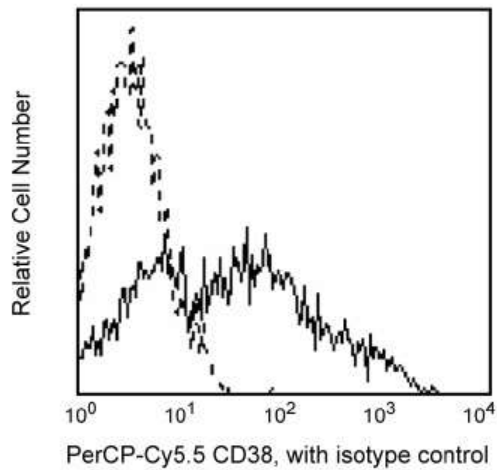


Imagen 15: Patrón de fluorescencia de linfocitos de sangre periférica humana normal, teñidos con PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse Anti-Human CD38.

### 3. 1. 6. 4. CD 27.

#### 3. 1. 6. 4. 1. DESCRIPCIÓN GENERAL.

Es un antígeno de membrana de los linfocitos T, que también puede encontrarse en forma soluble, como sCD27, en el sobrenadante de los medios donde se cultivan los linfocitos o en los líquidos biológicos de personas sanas. El CD27 pertenece a la familia de receptores que incluyen: los receptores I y II para TNF (TNFRI y TNFRII), los receptores de los factores de crecimiento de los nervios, el antígeno CD40 de los linfocitos B y el antígeno Fas.<sup>73</sup> Todas las proteínas de esta familia tienen una participación importante en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de una gran cantidad de células.

El CD 27 sólo se encuentra sobre la membrana de células linfoides, T o B y de las células NK.<sup>74</sup> Sin embargo, se le considera un marcador de los linfocitos T que se expresa preferentemente en la membrana de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, TCR CD3<sup>high</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup> y CD27<sup>+</sup>. Una vez activados, los linfocitos T se convierten en células CD45RO+RA-, las cuales parecen tener relación con la conservación de la memoria inmunológica y pueden continuar expresando CD27, pero ya en una cantidad mucho menor. Más bien, después de activados producen una forma soluble del mismo antígeno o sCD27.

El ligando para el CD27 que expresan los linfocitos T “vírgenes” es el antígeno CD70 que puede estar presente sobre la membrana de los linfocitos B. Se considera que la unión CD27-CD70 representa una señal coestimuladora que es crítica para activar los linfocitos T. Asimismo, CD27 participa en la síntesis de anticuerpos cuya producción depende de la colaboración de linfocitos T.

#### 3. 1. 6. 4. 2. CARACTERÍSTICAS DEL FLUOROCROMO (Anti-Human CD 27 APC).

Número de catálogo: 17-027973

Marca: Bioscience™

Nombre: CD 27. También conocido como TNFRSF7.

Tamaño: 100 tests

Status regulador: RUO

Clon: 0323

Formato: APC

Tamaño molecular: ninguno.

Reactividad: humana.

Aplicaciones: test de citometría de flujo.

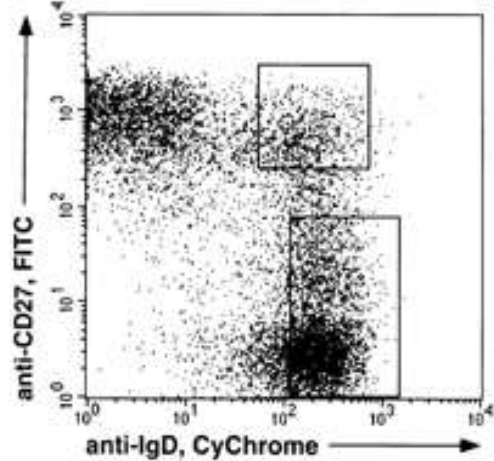


Imagen 16: imagen de células mononucleares de sangre periférica, estudiada por un citómetro tipo FACS Calibur (Ig D/CD27)

### 3. 1. 6. 5. CD 3.

#### 3. 1. 6. 5. 1. DESCRIPCIÓN GENERAL.

El antígeno CD3 comprende un complejo proteico que se codifica en el brazo corto del cromosoma 11 y es de gran importancia en la transducción de señales en los linfocitos T. El CD3 está compuesto por tres cadenas polipeptídicas designadas como  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  no polimórficas, que se unen para formar los heterodímeros CD3 $\gamma\epsilon$ , CD3 $\delta\epsilon$  y adicionalmente a estas cadenas se une el homodímero CD3 $\zeta\zeta$ .<sup>75</sup> Los heterodímeros poseen segmentos peptídicos de 5 - 10 aminoácidos (aa) ricos en cisteína<sup>76</sup> que desempeñan un papel importante en la transducción de señales.<sup>77</sup>

Su peso molecular es de  $\gamma$ : 25-28;  $\delta$ : 20,  $\epsilon$ :20 kDa y su naturaleza bioquímica lo encuadra dentro de la familia de las inmunoglobulinas.

Su función biológica en la célula es: intervenir en la transducción de señales, expresión del TCR en la superficie de la célula y asociación a este último receptor. Se expresa específicamente en timocitos y células T.<sup>3</sup>

### 3. 1. 6. 5. 2. CARACTERÍSTICAS DEL FLUOROCROMO (Pacific Blue™ Mouse Anti-Human CD3).

Número de catálogo: 558124

Marca: BD Pharmingen™

Nombre: CD3

Tamaño: 100 test (0.1mg)

Status regulador: RUO

Clon: SP34-2

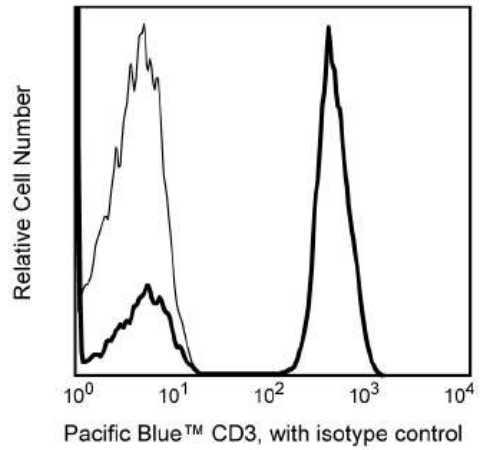
Formato: Pacific Blue

Isotipo: IgG1,  $\lambda$

Tamaño molecular: ninguno

Reactividad: Baboon, Cynomolgus, Rhesus

Aplicaciones: test de citometría de flujo.



**Imagen 17:** patrón de fluorescencia de linfocitos de sangre periférica humana normal teñidos Pacific Blue™ Mouse Anti-Human CD3.



### **3. 2. SUJETOS.**

#### **3. 2. 1. SUJETOS DEL ESTUDIO.**

Se estudiaron 50 sujetos sanos donantes de sangre, a los que se le realizó extracción sanguínea por vía venosa periférica.

#### **3. 2. 2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

- Aceptación y firma del consentimiento informado por escrito del paciente.
- Ambos sexos.
- Edad entre 18-65 años.
- Analítica general (bioquímica, orina y hemograma), análisis de autoinmunidad (FR, anti-CCP, HLA B27, ANAs, Anti-DNA, ENAs, ANCAs y ECA) junto con serología normal.

#### **3. 2. 3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

##### **3. 2. 3. 1. PADECER ALGUNA DE LAS SIGUIENTES CAUSAS DE LINFOCITOSIS.<sup>17,18</sup>**

**Electromagnético, física, traumatismo, causas radiactivas**

[Agotamiento por calor](#)

**Trastornos infecciosos (agente específico)**

[Enfermedades virales](#)

[Gripe](#)

[Linfocitosis infecciosa aguda](#)

[Neumonía viral](#)

[Hepatitis viral](#)

[Eritema infeccioso](#)

[Fiebre tifoidea](#)

[Mononucleosis infecciosa](#)

[Neumonía por micoplasma](#)

[Paperas](#)

[Rubéola](#)

[Sífilis](#)

[Tuberculosis](#)

[VIH primario, síndrome infeccioso](#)

[Meningitis, Tuberculosis](#)

[Coriomeningitis linfocítica](#)

[Tuberculosis, diseminado](#)

[Brucelosis](#)

[Fiebre por flebotomo](#)

[Micoplasma, Enfermedad por agente Eaton](#)

[Rickettsiosis pustulosa](#)

[Rickettsiosis transmitida por garrapatas](#)

[Tos ferina](#)

[Infección crónica por EBV](#)

[Hepatitis viral anictérica](#)

[Histoplasmosis](#)

[Linfogranuloma venéreo](#)

[Toxoplasmosis](#)

[Tripanosomiasis](#)

[Tuberculosis pulmonar](#)

[Malaria](#)

[Tuberculosis de la médula espinal](#)

[Viruela](#)

### **Trastornos neoplásicos**

[Enfermedad de Hodgkin](#)

[Leucemia linfocítica Aguda y Crónica](#)

[Leucemia de linfocitos T](#)

[Leucemia prolinfocítica](#)

[Carcinoma de cuello uterino](#)

[Linfoma maligno no Hodgkins](#)

[Macroglobulinemia de Waldenström](#)

[Mieloma múltiple](#)

[Histiocitosis maligna](#)

[Enfermedad de cadena pesada alfa](#)

### **Trastornos alérgicos, del colágeno, autoinmunes**

[Colitis ulcerosa](#)

[Púrpura trombocitopénica idiopática](#)

### **Congénitos, trastornos del desarrollo**

[Síndrome de candidiasis mucocutánea crónica](#)

[Aplasia tímica congénita \(diGeorge\)](#)

[Hipoplasia de timo, Síndrome de DiGeorge](#)

[Imundeficiencia, células B y T combinadas](#)

[Síndrome de Job \(Síndrome de hiper IgE\)](#)

#### **Trastornos genéticos, familiares, hereditarios**

[Osteopetrosis \(Albers-Schonberg\)](#)

[Talasemia mayor](#)

[Esferocitosis, hereditaria](#)

[Síndrome de Wiskott-Aldrich](#)

[Sínd. de inmunodeficiencia combinada grave](#)

#### **Trastornos vegetativos, autonómicos, endócrinos**

[Tirotoxicosis \(enfermedad de Graves\)](#)

[Enfermedad de Addison \(insuficiencia suprarrenal crónica\)](#)

[Insuficiencia hipofisaria](#)

#### **Referencia a sistema de órganos**

[Insuficiencia hepática](#)

[Anemia aplásica](#)

[Púrpura trombótica trombocitopénica \(PTT\)](#)

#### **Fisiopatológico**

[Alteración de la inmunidad mediada por células](#)

[Trastornos de linfocitos T](#)

[Defecto inmunitario de linfocitos T colaboradores](#)

## **Drogas**

[Administración medicamentos antimetabolitos](#)

[Griseofulvina](#)

[Niacina, ácido nicotínico](#)

[Quimioterapia, cáncer \(antineoplásico\)](#)

[Cushing secundario, síndrome medicamentoso](#)

[Natalizumab, Rituximab, Belimumab](#)

## **Envenenamiento (compuesto específico)**

[Heroína, uso de morfina](#)

[Micotoxina, tricoteceno](#)

## **3. 2. 3. 2. PADECER ALGUNA DE LAS SIGUIENTES CAUSAS DE LINFOPENIA.** <sup>17,18</sup>

### **Causas de traumatismo**

[Traumatismo abdominal linfático](#)

### **Electromagnético, física, traumatismo, causas radiactivas**

[Radioterapia](#)

### **Quirúrgico, complicación de procedimiento**

[Ligadura quirúrgica del conducto torácico](#)

### **Trastornos infecciosos (agente específico)**

[Enfermedades bacterianas](#)

[Gastroenteritis viral](#)

[Infección bacteriana](#)

[Varicela, virus herpes zóster](#)

[Varicela](#)

[Hepatitis viral](#)

[Infección bacteriana sistémica](#)

[Inmunodeficiencia adquirida \(SIDA/VIH\)](#)

[Neumonía por pneumocystis carinii \(PCP\)](#)

[VIH primario](#)

[Tétano](#)

[Ehrlichiosis granulocítica](#)

[Enfermedad del legionario](#)

[Fiebre amarilla](#)

[Fiebre por flebótomo](#)

[Sarampión \(rubéola\)](#)

[Enfermedad de Whipple](#)

[Poliomielitis](#)

### **Granulomatoso, Trastornos inflamatorios**

[Sarcoidosis](#)

### **Trastornos neoplásicos**

[Enfermedad de Hodgkin](#)

[Metástasis](#)

[Leucemia mielógena crónica](#)

[Síndrome de Zollinger-Ellison](#)

[Tumor cerebral, maligno \(astrocitoma\)](#)

[Adenocarcinoma gástrico](#)

[Adenocarcinoma de mama](#)

[Carcinoma esofágico](#)

[Linfadenopatía angioinmunoblástica](#)

[Histiocitosis maligna](#)

### **Trastornos alérgicos, del colágeno, autoinmunes**

[Síndrome nefrótico](#)

[Síndrome de Guillain Barre](#)

[Enfermedad celíaca](#)

[Lupus eritematoso sistémico \(LES\)](#)

[Lupus medicamentoso](#)

### **Trastornos metabólicos, de almacenamiento**

[Diabetes mellitus, mal controlada](#)

[Diabetes mellitus](#)

[Lactosuria](#)

### **Congénitos, trastornos del desarrollo**

[Síndrome de candidiasis mucocutánea crónica](#)

[Aplasia tímica congénita \(diGeorge\)](#)

[Inmunodeficiencia, células B y T combinadas](#)

[Aagammaglobulinemia congénita](#)

[Síndrome de hipoplasia cartílago-cabello](#)

[Síndrome de Job \(Síndrome de hiper IgE\)](#)

### **Trastornos genéticos, familiares, hereditarios**

[Ataxia telangiectasia](#)

[Síndrome de Wiskott-Aldrich](#)

[Síndrome de inmunodeficiencia combinada grave](#)

### **Anatómico, cuerpo extraño, trastornos estructurales**

[Fístula en el conducto torácico](#)

[Obstrucción del conducto torácico](#)

[Ruptura del conducto torácico](#)

[Pericarditis constrictiva crónica](#)

### **Trastornos vegetativos, autonómicos, endócrinos**

[Enfermedad de Cushing](#)

[Miastenia grave](#)

[Hipergastrinemia](#)

### **Referencia a sistema de órganos**

[Insuficiencia renal aguda \(IRA\)](#)

[Insuficiencia renal crónica \(uremia/azoemia\)](#)

[Inmunodeficiencia común variable](#)

### **Fisiopatológico**

[Alteración de la inmunidad mediada por células](#)

[Trastornos de linfocitos T](#)

[Defecto inmunitario de linfocitos T helpers](#)



## **Drogas**

[Administración de medicamento antimetabolitos](#)

[Corticoesteroides](#)

[Toxicidad por litio](#)

[Clorambucil](#)

[Litio](#)

[Quimioterapia](#)

[Cushing secundario](#)

[Globulina antilinfocítica](#)

## **Envenenamiento orgánico (intoxicación)**

[Insuficiencia renal tóxica](#)

### **3. 3. PROTOCOLO DE ESTUDIO. VARIABLES CONSIDERADAS.**

#### **3. 3. 1. DESCRIPCIÓN DE PROTOCOLOS.**

##### **3. 3. 1. 1. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.**

Se obtuvieron 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA de todos los sujetos estudiados.

La flebotomía, en todos los casos se efectuó entre las 7:00h y las 9:00h, de la mañana.

La cuenta de leucocitos se realizó del tubo con anticoagulante EDTA en un Technicon H-1, para obtener los valores absolutos y relativos de linfocitos para cada participante, constatándose la ausencia de leucopenia y/o linfocitosis.

Posteriormente, se realizó a todas muestras frotis sanguíneo para el análisis morfológico de las células hemáticas y realización del recuento diferencial linfocitario (RDL).

El transporte de las muestras desde el lugar de extracción hacia el laboratorio, se realizó en nevera portátil cerrada en un tiempo siempre menor de 10 minutos desde el momento de extracción.

##### **3. 3. 1. 2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.**

Las muestras siempre fueron procesadas en el citómetro por la misma persona (D. Alejandro Muñoz Jiménez, *médico del Servicio de Reumatología del H. U. Virgen de Valme, Sevilla*) según los procedimientos que se expresan a continuación.

### 3. 3. 1. 2. 1. PROCEDIMIENTO 1 (SF)

1. Del tubo con anticoagulante EDTA se tomaron 50  $\mu$ l de sangre total a los que se agregaron los siguientes fluorocromos en las dosis que se expresan en la tabla 2.

NOMBRE	FORMATO	DOSIS ( $\mu$ l)
IgD	PE	2,5
CD3	Pacific Blue	5
CD19	PAC Cy7	5
CD27	APC	5
CD38	PerCp Cy5.5	5

Tabla 2: nombre, formato y dosis de los 5 fluorocromos utilizados en el experimento.

2. Incubación a 15 min a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

3. Tras completarse este periodo, se añaden 2 ml de solución lisante BD FACs (concentrada 10x) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

4. Incubación durante unos 10 min a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

5. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

6. Decantación manual e individual de sobrenadante.

7. Se añaden 2 ml de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

8. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

9. Decantación manual e individual de sobrenadante.

10. Se añaden 100 $\mu$ l de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

11. Se pasa la muestra por el citómetro, en no más de unos 10-20 minutos en todos los casos.

### **3. 3. 1. 2. 2. PROCEDIMIENTO 2 (FM).**

1. Del tubo con anticoagulante EDTA se tomaron 50 µl de sangre total a los que se agregaron los siguientes fluorocromos en las dosis que se expresan en la tabla 2.

2. Incubación a 15 minutos a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

3. Tras completarse este periodo, se añaden 2 ml de solución lisante BD FACs (concentrada 10x) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

4. Incubación durante unos 10 minutos a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

5. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

6. Decantación manual e individual de sobrenadante.

7. Se añaden 2 ml de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

8. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

9. Decantación manual e individual de sobrenadante.

10. Se añaden 100µl de formaldehído al 5% y resuspendemos (con dilutor mecánico).

11. La muestra se pasa inmediatamente a un refrigerador a una temperatura de unos 4°C.

12. Tras 24h, se pasa la muestra por el citómetro, en no más de unos 10-20 minutos en todos los casos.

### **3. 3. 1. 2. 3. PROCEDIMIENTO 3 (Lysis).**

1. Del tubo con anticoagulante EDTA se tomaron 50  $\mu$ l de sangre total a los que se agregaron los siguientes fluorocromos en las dosis que se expresan en la tabla 2.

2. Incubación a 15 minutos a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

3. Tras completarse este periodo, se añaden 2 ml de solución lisante BD FACs (concentrada 10x) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

4. La muestra se pasa inmediatamente a un refrigerador a una temperatura de unos 4°C.

5. Tras 24h, centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

6. Decantación manual e individual de sobrenadante.

7. Se añaden 2 ml de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

8. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

9. Decantación manual e individual de sobrenadante.

10. Se añaden 100 $\mu$ l de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

11. Se pasa la muestra por el citómetro, en no más de unos 10-20 minutos en todos los casos.

### **3. 3. 1. 2. 4. PROCEDIMIENTO 4 (SF24h).**

La muestra se mantiene durante unas 24 horas, a temperatura ambiente y en condiciones de absoluta oscuridad. Después se completa el siguiente procedimiento:

1. Del tubo con anticoagulante EDTA se tomaron 50  $\mu$ l de sangre total a los que se agregaron los siguientes fluorocromos en las dosis que se expresan en la tabla 2.

2. Incubación a 15 minutos a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

3. Tras completarse este periodo, se añaden 2 ml de solución lisante BD FACs (concentrada 10x) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

4. Incubación durante unos 10 minutos a temperatura ambiente (22°C) en condiciones de absoluta oscuridad.

5. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

6. Decantación manual e individual de sobrenadante.

7. Se añaden 2 ml de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

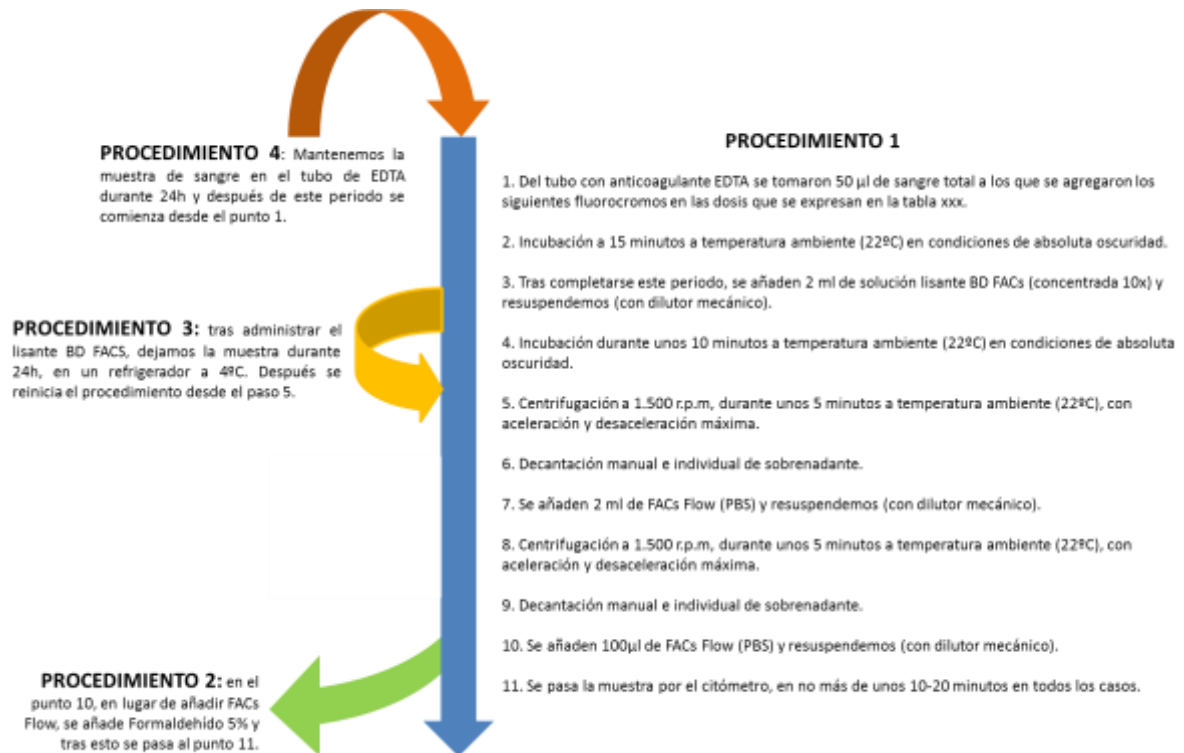
8. Centrifugación a 1.500 r.p.m, durante unos 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), con aceleración y desaceleración máxima.

9. Decantación manual e individual de sobrenadante.

10. Se añaden 100 $\mu$ l de FACs Flow (PBS) y resuspendemos (con dilutor mecánico).

11. Se pasa la muestra por el citómetro, en no más de unos 10-20 minutos en todos los casos.

### 3. 3. 1. 2. 5. DIAGRAMA ACLARATORIO.



### 3. 3. 1. 3. PROCESAMIENTO EN EL CITÓMETRO.

Las muestras siempre fueron procesadas en el citómetro por la misma persona (D<sup>a</sup> Elides Marín, *Labs Manager, Rheumatology, Allergy and Immunology Unit laboratory; Strong Memorial Hospital of Rochester, New York, USA*) según los procedimientos que se expresan a continuación.

Todas las alícuotas de sangre fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II, a 22°C y en condiciones de absoluta oscuridad.

#### 3. 3. 1. 3. 1. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.

Previo a la adquisición de muestras en el citómetro, cada día el citómetro fue compensado en su voltaje utilizando para ello los distintos fluorocromos procesados, no sobre la propia sangre sino utilizando *SC Anti-mouse Compensation Standard*<sup>®</sup> según el protocolo de preparación que se presenta a continuación:

1. 100µl de FACs Buffer en un tubo.
2. Añadimos 1µl de cada uno de los fluorocromos utilizados (CD3, CD27, CD38, CD19 e IgD) en tubos distintos y posteriormente, el resto de pasos se realiza sobre cada uno de ellos.
3. Añadimos dos gotas de SC Anti-mouse Compensation Standard®.
4. Incubamos durante 15 minutos, en un refrigerador a 4°C.
5. Añadimos 0,5ml de Facs Buffer.
6. Centrifugación a 3.000rpm, durante 5 minutos a una temperatura de 22°C.
7. Se decanta el sobrenadante.
8. Añadimos 150µl de FACs Buffer.

Esta calibración tiene como finalidad maximizar la resolución y establecer el ruido de fondo para descartarlo de los ensayos realizados, establecer un nivel base (línea base) para la detección de fluorescencia, permitiendo la apropiada discriminación de poblaciones positivas y negativas con la menor interferencia y la mejor reproducibilidad de los resultados.

Para establecer la línea de base el software determina la Intensidad media de fluorescencia (MFI) y el coeficiente de variación robusto (CVr) para las diferentes perlas en todos los detectores y posteriormente se emplean algoritmos para determinar la MFI y el tamaño para diferenciar la señal de cada tipo de perla (bright, mid, dim). Es a partir de estos datos que el software es capaz de calcular el background relativo (Br) y la eficiencia relativa de detección de fluorescencia (Qr), la desviación estándar del ruido electrónico y la configuración para la mejor resolución de poblaciones en todos los detectores.

Una vez se establece la línea de base se debe realizar -y así lo hicimos- diariamente el control de funcionamiento con las mismas muestras de *SC Anti-mouse Compensation Standard*, para estar alerta de posibles desviaciones del valor basal establecido.



### **3. 3. 1. 3. 2. CONTROL DE CALIDAD DE DETECTORES CON PERLAS MULTICOLOR.**

Adicionalmente a la calibración y el control diario es necesario realizar procedimientos para comprobar la alineación de cada laser respecto a la celda de flujo. Para esto se emplearon perlas multicolores Rainbow Beads (Sphero). Estas perlas son partículas fluorescentes de diámetro determinado marcadas con una mezcla fluorocromos que se excitan en un rango entre 365 y 650nm y que emiten fluorescencia en un espectro compatible con casi cualquier fluorocromo que se pueda emplear en inmunofenotipificación. Durante este proceso de comprobación de la alineación las partículas deben generar un pulso con una máxima amplitud y el menor valor para el ancho posible; posteriormente se genera un histograma que debe ser lo más alto y estrecho posible y con un CV menor a 5%.<sup>78</sup>

### **3. 3. 1. 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

Las muestras siempre fueron procesadas en el citómetro por la misma persona (Dr. André Ballesteros Tato, *Research, Troy's Laboratory; Strong Memorial Hospital of Rochester, New York, USA*).

El análisis de resultados se realizó con el uso del programa informático llamado FlowJo®, programa especialmente diseñado para el análisis de los datos obtenidos en el citómetro.

Además de manejar análisis de datos immunophenotyping fácilmente, FlowJo también tiene plataformas especiales del análisis de datos: Ciclo celular, cinética (flujo del calcio), proliferación (CFSE), comparación estadística de muestras, calibración (cuantificación), y remuneración.

FlowJo provee los gráficos y las tablas de la publicación. Puede diseñar las disposiciones gráficas y tabulares, con el control total sobre las fuentes, los colores, y los estilos de los gráficos.

Una de las características más significativas de FlowJo es su capacidad de gran alcance del análisis de la hornada. El copiado de cualquier análisis (puertas,

estadísticas, plataformas) es tan fácil como drag-and-drop: a otras muestras, o a los experimentos enteros.

Finalmente, puede asegurarse de que todas las muestras tengan exactamente el mismo análisis, o usted tiene la flexibilidad para tener modificaciones muestra-específicas de ciertas puertas sin afectar a capacidades del análisis de la hornada.

**En el ANEXO I y II, se adjuntan los análisis de resultados de todos los pacientes según los distintos procesamientos de muestras.**

### **3. 3. 2. VARIABLES CONSIDERADAS.**

- Porcentaje, medias y medianas de subpoblaciones linfocitarias tipo B, según clasificación de the Freiburg, Paris and EUROclass classifications.

- Double negatives (DN).
- Naive.
- Switched memory.
- Unswitched memory.

- Porcentaje, medias y medianas de subpoblaciones linfocitarias tipo B, según clasificación Bm mature.

- Bm1.
- Bm2.
- Bm2' (pre GC).
- Bm 3y4.
- Late Bm 5.
- Early Bm 5.

- Intensidad de fluorescencia de los distintos fluorocromos en cada una de las subpoblaciones linfocitarias tipo B.

- CD 19.
- IgD en DN.

- IgD en Naive.
- IgD en Switched Memory.
- IgD en Unswitched Memory.
- CD27 en DN.
- CD27 en Naïve.
- CD27 en Switched Memory.
- CD27 en Unswitched Memory.
- CD38 en Bm1.
- CD38 en Bm2.
- CD38 en Bm2' (PG).
- CD38 en Bm3y4.
- CD38 en EarlyBm5.
- CD38 en LateBm5.
- IgD en Bm1.
- IgD en Bm2.
- IgD en Bm2' (PG).
- IgD en Bm3y4.
- IgD en EarlyBm5.
- IgD en LateBm5.

- Diferencias existentes en las medias y medianas de las subpoblaciones linfocitarias tipo B, cuando se comparan los distintos procedimientos de muestra (SF24h, Lysis y FM) respecto al procedimiento considerado como Gold Standard (SF).

- CD19. SF\_FM
- CD19. SF\_LYSIS
- CD19. SF\_SF24H
- Naive. SF\_FM
- Naive. SF\_LYSIS
- Naive. SF\_SF24H
- DN. SF\_FM
- DN. SF\_LYSIS

- DN. SF\_SF24H
- UnswitchedMemory. SF\_FM
- UnswitchedMemory. SF\_LYSIS
- UnswitchedMemory. SF\_SF24H
- SwitchedMemoryPB. SF\_FM
- SwitchedMemoryPB. SF\_LYSIS
- SwitchedMemoryPB. SF\_SF24H
- Bm1. SF\_FM
- Bm1. SF\_LYSIS
- Bm1. SF\_SF24H
- Bm2. SF\_FM
- Bm2. SF\_LYSIS
- Bm2. SF\_SF24H
- Bm3y4. SF\_FM
- Bm3y4. SF\_LYSIS
- Bm3y4. SF\_SF24H
- PreGC. SF\_FM
- PreGC. SF\_LYSIS
- PreGC. SF\_SF24H
- LateBm5. SF\_FM
- LateBm5. SF\_LYSIS
- LateBm5. SF\_SF24H
- EarlyBm5. SF\_FM
- EarlyBm5. SF\_LYSIS
- EarlyBm5. SF\_SF24H

- Diferencias existentes en las medias y medianas de las intensidades de fluorescencia de los distintos fluorocromos utilizados para el estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B, cuando se comparan los distintos procedimientos de muestra (SF24, Lysis y FM) respecto al procedimiento considerado como Gold Standard (SF).

- CD19. SF\_FM

- CD19. SF\_LYSIS
- CD19. SF\_SF24H
- IgD.DN. SF\_FM
- IgD.DN. SF\_LYSIS
- IgD.DN. SF\_SF24H
- IgD.Naive. SF\_FM
- IgD.Naive. SF\_LYSIS
- IgD.Naive. SF\_SF24H
- IgD.Unswitched. SF\_FM
- IgD.Unswitched. SF\_LYSIS
- IgD.Unswitched. SF\_SF24H
- IgD.Switched. SF\_FM
- IgD.Switched. SF\_LYSIS
- IgD.Switched. SF\_SF24H
- CD27.DN. SF\_FM
- CD27.DN. SF\_LYSIS
- CD27.DN. SF\_SF24H
- CD27.Naive. SF\_FM
- CD27.Naive. SF\_LYSIS
- CD27.Naive. SF\_SF24H
- CD27.Unswitched. SF\_FM
- CD27.Unswitched. SF\_LYSIS
- CD27.Unswitched. SF\_SF24H
- CD27.Switched. SF\_FM
- CD27.Switched. SF\_LYSIS
- CD27.Switched. SF\_SF24H
- CD38.BM1. SF\_FM
- CD38.BM1. SF\_LYSIS
- CD38.BM1. SF\_SF24H
- CD38.BM2. SF\_FM
- CD38.BM2. SF\_LYSIS

- CD38.BM2. SF\_SF24H
- CD38.BM2P. SF\_FM
- CD38.BM2P.SF\_LYSIS
- CD38.BM2P.SF\_SF24H
- CD38.BM3y4.SF\_FM
- CD38.BM3y4.SF\_LYSIS
- CD38.BM3y4.SF\_SF24H
- CD38.EarlyBM5.SF\_FM
- CD38.EarlyBM5.SF\_LYSIS
- CD38.EarlyBM5.SF\_SF24H
- CD38.LateBM5.SF\_FM
- CD38.LateBM5.SF\_LYSIS
- CD38.LateBM5.SF\_SF24H
- IgD.BM1.SF\_FM
- IgD.BM1.SF\_LYSIS
- IgDBM1.SF\_SF24H
- IgD.BM2.SF\_FM
- IgD.BM2.SF\_LYSIS
- IgD.BM2.SF\_SF24H
- IgD.BM2P.SF\_FM
- IgD.BM2P.SF\_LYSIS
- IgD.BM2P.SF\_SF24H
- IgD.BM3y4.SF\_FM
- IgD.BM3y4.SF\_LYSIS
- IgD.BM3y4.SF\_SF24H
- IgD.EarlyBM5.SF\_FM
- IgD.EarlyBM5.SF\_LYSIS
- IgD.EarlyBM5.SF\_SF24H
- IgD.LateBM5.SF\_FM
- IgD.LateBM5.SF\_LYSIS
- IgD.LateBM5.SF\_SF24H

### **3. 4. METODOLOGIA ESTADISTICA.**

#### **3. 4. 1. TAMAÑO MUESTRAL.**

El objetivo principal de este estudio es la estimación del coeficiente  $\alpha$  de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (CCI) como medidas de fiabilidad entre dos mediciones globales realizadas a muestras de sangre de 11 diferentes subpoblaciones con dos técnicas de cuatro cada vez [SF (gol estándar siempre)/ OTRA TÉCNICA]. Para el cálculo del número mínimo de muestras necesarias para este estudio, asumimos valores esperados de ambos coeficientes obtenidos de una experiencia previa, un nivel de confianza del 95%, una precisión o amplitud del intervalo de 0,05 (o 0,01), la realización de dos mediciones por muestra de sangre y un modelo de dos factores de efectos mixtos. Con toda esta información se necesita un mínimo de 50 muestras de sangre.

Estos cálculos se determinaron a partir de las fórmulas de Bonett (Psychometrika 2000; 65: 23-28 y Statist. Med. 2002; 21:1331-1335) y con ayuda de hojas de cálculo Excel.

#### **3. 4. 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

En primer lugar se realizó una depuración estadística de los datos con métodos numéricos y gráficos. Las variables cuantitativas se resumieron con medias y desviaciones típicas o con medianas y percentiles p25 y p75 en caso de distribuciones asimétricas, y las variables cualitativas con porcentajes. Para analizar las propiedades de las dos técnicas de medición y las relaciones entre sus elementos, se obtuvo el índice Alfa de Cronbach, medida global de replicabilidad o consistencia interna de las dos técnicas en su conjunto. Asimismo, para estudiar la concordancia entre las mediciones SF y OTRA TÉCNICA, se calculó el coeficiente de correlación intraclase y un intervalo al 95% de confianza para el mismo, además de contrastarse la hipótesis de que dicho coeficiente fuera nulo en la población. Finalmente, para mostrar la concordancia entre las mediciones de las técnicas SF y OTRA TÉCNICA se realizaron gráficos Bland Altman, método gráfico de comparación de dos técnicas cuantitativas

que revela la relación existente entre la diferencia de las dos medidas y la magnitud promedio de las mismas, además de buscar cualquier tendencia sistemática e identificar posibles outliers. Si las diferencias detectadas en el intervalo (media  $\pm$  1,96\*SD) no son clínicamente importantes entonces los dos métodos son intercambiables.

El análisis de los datos se realizó con el programa IBM SPSS 19.0 para Windows.

### **3. 4. 3. CONCORDANCIA. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN INTRACLASE Y MÉTODO DE BLAND Y ALTMAN.**

Las técnicas de análisis de la concordancia dependen del tipo de variable a estudiar. El índice estadístico más utilizado, para el caso de variables cualitativas, es el coeficiente kappa.<sup>2</sup> Si las variables son cuantitativas, se utiliza habitualmente el coeficiente de correlación intraclase.<sup>1</sup> El concepto básico subyacente del coeficiente de correlación intraclase fue introducido originalmente por Fisher como una formulación especial de la *r* de Pearson, basándose en un modelo de análisis de la varianza.<sup>1</sup> Las dificultades para interpretar desde el punto de vista clínico los valores de este coeficiente y otras desventajas metodológicas han hecho que algunos autores propongan métodos alternativos para estudiar la concordancia de este tipo de variables. Así, Bland y Altman (1995)<sup>79</sup> proponen un método gráfico y muy sencillo, basado en el análisis de las diferencias individuales, que permite determinar los límites de concordancia y visualizar de forma gráfica las discrepancias observadas. Recientemente, otros métodos de análisis de concordancia han sido propuestos.<sup>3</sup>

Para el caso de variables cuantitativas, es frecuente que el análisis de la concordancia se aborde mediante técnicas estadísticas inapropiadas. Con frecuencia ha sido utilizado el cálculo del coeficiente de correlación de lineal (*r*) de Pearson como índice de concordancia. Sin embargo, ésta no resulta una medida adecuada del grado de acuerdo entre dos mediciones, ya que si dos instrumentos miden sistemáticamente cantidades diferentes uno del otro, la correlación puede ser perfecta ( $r=1$ ), a pesar de que la concordancia sea nula. No se debe olvidar que el coeficiente de correlación de Pearson no proporciona información sobre el acuerdo observado, y solamente mide la



asociación lineal entre dos variables.<sup>7</sup> Así mismo, al calcularse a partir de los pares ordenados de mediciones, si varía el orden también cambia el valor del coeficiente,<sup>7</sup> mientras que un cambio en las escalas de medida no afecta a la correlación pero sí afecta a la concordancia. A su vez, debemos mencionar que la idea de que si el coeficiente de correlación entre dos medidas es significativamente diferente de cero la fiabilidad es buena, es incorrecto. El coeficiente de correlación lineal puede ser muy pequeño y resultar significativo si el tamaño muestral es suficientemente grande. Por último, tampoco la comparación de medias mediante un test t de Student con datos apareados es una técnica adecuada para este tipo de análisis.

Desde el punto de vista matemático, el índice más apropiado para cuantificar la concordancia entre diferentes mediciones de una variable numérica es el llamado coeficiente de correlación intraclass (CCI).<sup>71</sup> Dicho coeficiente estima el promedio de las correlaciones entre todas las posibles ordenaciones de los pares de observaciones disponibles y, por lo tanto, evita el problema de la dependencia del orden del coeficiente de correlación. Así mismo, extiende su uso al caso en el que se disponga de más de dos observaciones por sujeto. Por todo ello, ha sido el método que hemos utilizado para el estudio de correlación entre los distintos procesamientos de muestra –sangre periférica– de cara a su uso en la citometría de flujo para el estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B.

Sin embargo, una de las principales limitaciones del CCI es la dificultad de su cálculo, ya que debe ser estimado de distintas formas dependiendo del diseño del estudio.<sup>80</sup> La forma de cálculo más habitual se basa en un modelo de análisis de la varianza (ANOVA) con medidas repetidas. La idea es que la variabilidad total de las mediciones se puede descomponer en dos componentes: la variabilidad debida a las diferencias entre los distintos sujetos y la debida a las diferencias entre las medidas para cada sujeto. Esta última, a su vez, depende de la variabilidad entre observaciones y una variabilidad residual o aleatoria asociada al error que conlleva toda medición. El CCI se define entonces como *la proporción de la variabilidad total que se debe a la variabilidad de los sujetos*.

En la actualidad el valor del CCI puede obtenerse de modo directo con algunos programas informáticos como el SPSS. Otra forma sencilla de obtener el valor del CCI es a partir de una tabla ANOVA para medidas repetidas.

Como toda proporción, los valores del CCI pueden oscilar entre 0 y 1, de modo que la máxima concordancia posible corresponde a un valor de  $CCI=1$ . En este caso, toda la variabilidad observada se explicaría por las diferencias entre sujetos y no por las diferencias entre los métodos de medición o los diferentes observadores. Por otro lado, el valor  $CCI=0$  se obtiene cuando la concordancia observada es igual a la que se esperaría que ocurriera sólo por azar. A la hora de interpretar los valores del CCI, toda clasificación es subjetiva, si bien resulta útil disponer de una clasificación como la que proponen otros autores (Tabla 3).

>0,90	Muy buena
0,71-0,90	Buena
0,51-0,70	Moderada
0,31-0,50	Mediocre
<0,30	Mala o nula

Tabla 3: valoración de la concordancia según los valores del Coeficiente de Correlación Intraclassa (CCI).

Hasta ahora, se ha presentado la forma más habitual de cálculo del CCI. Para su cálculo en otras situaciones, así como para la obtención de intervalos de confianza, puede recurrirse a referencias más especializadas.<sup>8</sup>

A pesar de ser la medida de concordancia más adecuada par el caso de variables numéricas, el CCI presenta ciertas limitaciones. Junto a la dificultad inherente a su cálculo, el hecho de que se trate de una prueba paramétrica limita su uso al caso en el que se verifiquen las hipótesis necesarias. A saber: variables distribuidas según una normal, igualdad de varianzas e independencia entre los errores de cada observador. Así mismo, el valor del CCI depende en gran medida de la variabilidad de los valores observados: cuanto más homogénea sea la muestra estudiada, más bajo

tenderá a ser el valor del CCI. Pero quizás lo que más ha limitado la difusión del uso del CCI en la literatura médica es la carencia de interpretación clínica, que ha propiciado la aparición de otros métodos de análisis, mucho más intuitivo y fácilmente interpretables, como es el caso del análisis de las diferencias individuales: método de Bland y Altman.

Un sencillo procedimiento gráfico para evaluar la concordancia entre dos sistemas de medida es el propuesto por Bland y Altman.<sup>79</sup> Proponen un método sencillo a partir del análisis de las diferencias individuales que proporciona información complementaria al coeficiente de correlación intraclase. La diferencia de los resultados entre ambos métodos se representa en el eje de ordenadas y, su promedio, en el de abscisas. Lo ideal sería representar las diferencias observadas en relación con el verdadero valor de la variable de interés, lo que puede hacerse cuando uno de los métodos puede considerarse como el estándar de referencia (se estaría en una situación de evaluación de la validez de una prueba o medida). Sin embargo, cuando se evalúa la concordancia, se asume que ninguno de los métodos puede considerarse de referencia y se utiliza la media de ambos métodos como la mejor estimación disponible, así con el análisis de las diferencias frente a esta estimación puede decirse que se evalúa la repetibilidad.

Si la concordancia fuera perfecta, los puntos se situarían exactamente sobre la línea correspondiente a la diferencia igual a 0. Este gráfico también permite observar si la magnitud de las diferencias entre los métodos en el eje Y es similar para todos los valores de la variable (representados por los promedios de ambas mediciones en el eje X), o si las diferencias entre los métodos son mayores a medida que aumenta el valor de la variable.

Si las diferencias no varían según los valores de la variable, pueden analizarse las diferencias individuales: su media aritmética estima el sesgo relativo (diferencia sistemática entre ambos métodos) y su desviación estándar, el error aleatorio. Los límites del intervalo de dos desviaciones estándar alrededor de la media de las diferencias pueden considerarse como los límites de concordancia entre ambas mediciones, ya que este intervalo incluye el 95% de las diferencias observadas.

El método de *Bland y Altman* se centra en la valoración de la magnitud de la diferencia, ya que permite determinar los límites de concordancia observados. Estos valores deben compararse con los límites de concordancia establecidos previamente al inicio del estudio, que dependerán de la utilidad que se quiera dar a la medida. Este método considera la concordancia más como un concepto clínico que como uno estadístico. De esta forma, la determinación de la magnitud de las diferencias y su visualización gráfica facilitan su interpretación clínica y hacen que este método sea muy atractivo para los profesionales sanitarios.

#### **3.4.4. COEFICIENTE DE CONFIANZA INTERNA O ALFA DE CRONBACH.**

Se trata de un índice de consistencia interna que toma valores entre 0 y 1 y que sirve para comprobar si el instrumento que se está evaluando recopila información defectuosa y por tanto nos llevaría a conclusiones equivocadas o si se trata de un instrumento fiable que hace mediciones estables y consistentes.

Alfa es por tanto un coeficiente de correlación al cuadrado que, a grandes rasgos, mide la homogeneidad de los ítems promediando todas las correlaciones entre todos los ítems para ver que, efectivamente, se parecen.

Su interpretación será que, cuanto más se acerque el índice al extremo 1, mejor es la fiabilidad, considerando una fiabilidad respetable a partir de 0,80.

La confiabilidad de una medición o de un instrumento, según el propósito de la primera y ciertas características del segundo, puede tomar varias formas o expresiones al ser medida o estimada: coeficientes de precisión, estabilidad, equivalencia, homogeneidad o consistencia interna, pero el denominador común es que todos son básicamente expresados como diversos coeficientes de correlación.

La descripción resultante de los ítems o reactivos es resumida con el término homogeneidad, la cual es el grado en que una prueba o instrumento mide un solo factor, es decir, el grado en que los reactivos en una escala son unifactoriales. Más precisamente, el coeficiente de consistencia interna dependerá directamente de las correlaciones entre los ítems o reactivos, esto es, del grado en que los ítems midan la

misma variable. Mientras más homogéneos sean los ítems, mayor será el valor de la consistencia interna para un número dado de ítems.<sup>81</sup>

Mientras que el conocimiento del grado de validez de un instrumento permite usar significativamente los datos obtenidos con él, el conocimiento de su confiabilidad permite usar los datos correctamente.<sup>81</sup> Desde esta perspectiva práctica, muchas previsiones deben tomarse al momento de estimar e interpretar un coeficiente de consistencia interna. En este espacio nos ocuparemos de sólo dos de ellas. Primeramente, es oportuno destacar, y ya algo se ha dejado ver al respecto, que de manera “natural” el coeficiente de consistencia interna alfa de Cronbach expresa el grado en que los ítems miden la misma variable: homogeneidad. De tal manera que su utilidad original se orienta a calcular la confiabilidad de un instrumento cuyos ítems o reactivos conformen un único dominio, esto es, una variable o rasgo único. De esta manera, si su instrumento consta de o mide varias variables, es decir, tiene implícitamente subinstrumentos o subpruebas individuales, la recomendación es disponer de medidas de confiabilidad para cada subprueba. Más específicamente, los resultados del estudio deben reportar tantos alfa como subpruebas y variables o rasgos se tengan. El usuario de los resultados compuestos o combinados de un instrumento heterogéneo, debe ejecutar siempre verificaciones para ver si se dan estimaciones de confiabilidad para cada subprueba.<sup>81</sup>

En segundo lugar, se requiere comentar respecto a cómo interpretar un valor específico de alfa, esto es, cuál es el nivel satisfactorio de fiabilidad. Como regla general, las confiabilidades no deben ser inferiores a 0.80.<sup>81</sup>

## 4. RESULTADOS.

### 4. 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.

#### 4. 1. 1. ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TIPO B.

En nuestra serie de 50 pacientes, 25 (25%) eran hombres y 25 (25%) pacientes eran mujeres. De ellos, el 95% eran de raza caucásica y 5% negra.

**Tabla 4:** se expresan la media, desviación típica, valores máximo y mínimo, mediana y los percentiles 25 y 75% de cada una de las subpoblaciones linfocitarias tipo B estudiadas (CD19, Naive, DN, Unswitched Memory, Switched Memory, Bm1, Bm2, Bm3 y 4, PreGC, late Bm5 y early Bm5) según cada uno de los 4 procesamientos de muestras utilizados en nuestro estudio.

Supoblación Linf./ Procedimiento empleado	N		Percentiles(*)						
	Válidos	Perdidos	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	25	Mediana	75
CD19_SF	50	0	<b>11,7512</b>	<b>4,74546</b>	1,54	18,70	6,7375	13,1500	16,2500
CD19_FM	50	0	<b>11,1974</b>	<b>4,36453</b>	5,03	19,00	6,1750	12,0000	14,6250
CD19_Lysis	50	0	<b>12,2374</b>	<b>4,55786</b>	5,69	19,00	7,1800	13,0000	15,8750
CD19_SF24h	50	0	<b>12,8552</b>	<b>4,72680</b>	5,88	22,90	7,9700	13,3500	17,2000
Naive_SF	50	0	70,4680	8,06174	52,90	84,10	<b>62,7250</b>	<b>73,7000</b>	<b>76,2250</b>
Naive_FM	49	1	70,0000	9,97597	49,60	84,30	<b>61,1000</b>	<b>74,9000</b>	<b>77,8500</b>
Naive_Lysis	50	0	71,2000	8,45777	51,20	82,70	<b>65,6250</b>	<b>74,2000</b>	<b>77,4500</b>
Naive_SF24h	50	0	75,0700	9,86284	56,80	89,90	<b>66,3500</b>	<b>75,9000</b>	<b>84,8500</b>
DN_SF	50	0	<b>4,0524</b>	<b>2,08289</b>	,72	9,73	1,9325	4,6550	5,4725
DN_FM	49	1	<b>3,6339</b>	<b>1,54542</b>	,90	6,23	1,9000	3,9000	4,9550
DN_Lysis	50	0	<b>3,6080</b>	<b>2,05701</b>	,62	9,68	1,7950	3,6650	4,7600
DN_SF24h	50	0	<b>4,2076</b>	<b>2,34651</b>	,78	10,40	2,1925	3,5850	6,2575
UnswitchedMemory_SF	50	0	9,6474	5,32935	2,40	21,30	<b>5,0200</b>	<b>10,0500</b>	<b>13,3750</b>
UnswitchedMemory_FM	49	1	10,4280	6,95470	2,42	27,40	<b>4,6050</b>	<b>9,7300</b>	<b>11,5000</b>

UnswitchedMemory_Lysis	50	0	10,4214	6,00892	2,66	24,30	<b>5,5800</b>	<b>9,5200</b>	<b>14,3000</b>
UnswitchedMemory_SF24h	50	0	7,6118	5,11955	1,51	17,50	<b>2,6550</b>	<b>6,6700</b>	<b>13,5250</b>
SwitchedMemoryPB_SF	50	0	11,3804	4,61939	4,40	23,30	<b>7,5450</b>	<b>11,0000</b>	<b>15,2750</b>
SwitchedMemoryPB_FM	49	1	12,0104	5,13754	5,24	26,30	<b>8,3850</b>	<b>11,4000</b>	<b>14,1500</b>
SwitchedMemoryPB_Lysis	50	0	10,9432	4,41331	4,57	22,90	<b>7,6825</b>	<b>10,8000</b>	<b>13,2000</b>
SwitchedMemoryPB_SF24h	50	0	9,1532	5,38829	1,50	21,50	<b>4,7300</b>	<b>7,8350</b>	<b>11,8000</b>
Bm1_SF	50	0	6,9810	6,66850	,52	29,70	<b>3,3075</b>	<b>5,1000</b>	<b>9,0150</b>
Bm1_FM	46	4	6,9580	6,79995	2,18	31,00	<b>3,1225</b>	<b>4,3250</b>	<b>8,4775</b>
Bm1_Lysis	47	3	7,0511	6,06869	1,85	30,10	<b>3,4900</b>	<b>5,5800</b>	<b>7,9400</b>
Bm1_SF24h	46	4	7,9509	7,41965	2,04	34,00	<b>4,1025</b>	<b>5,3900</b>	<b>9,4225</b>
Bm2_SF	50	0	<b>73,9640</b>	<b>8,14403</b>	57,60	87,30	67,7000	73,0500	82,3250
Bm2_FM	46	4	<b>72,4543</b>	<b>5,79930</b>	55,80	84,30	69,4000	72,0500	76,4250
Bm2_Lysis	47	3	<b>72,4447</b>	<b>5,76533</b>	57,70	83,70	68,7000	71,5000	76,6000
Bm2_SF24h	46	4	<b>74,1065</b>	<b>7,10532</b>	54,40	83,90	70,7500	75,0000	79,9750
Bm3y4_SF	50	0	,5654	,52387	,00	2,77	<b>,2328</b>	<b>,4380</b>	<b>,7683</b>
Bm3y4_FM	46	4	,4838	,40394	,00	2,06	<b>,2628</b>	<b>,3485</b>	<b>,5965</b>
Bm3y4_Lysis	47	3	,5014	,31577	,00	1,27	<b>,3110</b>	<b>,3920</b>	<b>,7030</b>
Bm3y4_SF24h	46	4	,2434	,29096	,00	1,59	<b>,0579</b>	<b>,1660</b>	<b>,3380</b>
PreGC_SF	50	0	<b>2,9274</b>	<b>1,57481</b>	1,09	6,08	1,4100	2,8900	3,9275
PreGC_FM	46	4	<b>3,7659</b>	<b>1,85521</b>	1,09	6,87	1,8825	3,6900	5,8000
PreGC_Lysis	47	3	<b>3,7352</b>	<b>1,80837</b>	,98	7,01	1,9000	3,7400	5,5500
PreGC_SF24h	46	4	<b>3,0364</b>	<b>1,55066</b>	,88	5,59	1,4525	3,4650	4,3900
LateBm5_SF	50	0	<b>2,9516</b>	<b>1,84443</b>	,83	7,90	1,4550	2,5000	3,9100
LateBm5_FM	46	4	<b>3,8141</b>	<b>1,79190</b>	,66	6,65	2,1950	3,6300	5,6550
LateBm5_Lysis	47	3	<b>3,3452</b>	<b>1,46630</b>	,89	6,37	1,9100	3,4900	4,6300
LateBm5_SF24h	46	4	<b>2,9965</b>	<b>1,54420</b>	,83	5,87	1,6175	2,8700	4,1775

EarlyBm5_SF	50	0	<b>9,3420</b>	<b>4,84178</b>	1,98	24,00	5,2300	10,1100	12,4500
EarlyBm5_FM	46	4	<b>9,4278</b>	<b>3,97933</b>	4,27	18,40	5,4675	10,1000	12,4250
EarlyBm5_Lysis	47	3	<b>9,8519</b>	<b>4,52968</b>	4,47	23,60	5,6700	9,7600	13,3000
EarlyBm5_SF24h	46	4	<b>8,4352</b>	<b>3,20883</b>	4,34	14,60	5,7700	7,0300	11,0000

\*Distribución simétrica.

\*\*Procedimiento 1: SF; Procedimiento 2: FM; Procedimiento 3: Lysis; Procedimiento 4: SF24h.

**Tabla 5:** se expresan las diferencias encontradas en el recuento de subpoblaciones de linfocitos B (CD19, Naive, DN, Unswitched Memory, Switched Memory, Bm1, Bm2, Bm3 y 4, PreGC, late Bm5 y early Bm5) cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento “gold standard” (SF).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD19.SF_FM	50	0	,5538	1,62517	-3,85	6,45	<b>-,3275</b>	<b>,6250</b>	<b>1,3000</b>
CD19.SF_LYSIS	50	0	-,4862	1,18211	-4,50	2,10	<b>-1,1250</b>	<b>-,2900</b>	<b>,1200</b>
CD19.SF_SF24H	50	0	-1,1040	2,30218	-5,62	5,40	<b>-2,8250</b>	<b>-1,2650</b>	<b>,2275</b>
Naive.SF_FM	49	1	<b>,3796</b>	<b>4,61537</b>	-14,80	9,80	-2,1500	,3000	3,4500
Naive.SF_LYSIS	50	0	<b>-,7320</b>	<b>3,53798</b>	-9,00	5,70	-3,1250	,1500	1,5250
Naive.SF_SF24H	50	0	<b>-4,6020</b>	<b>8,21411</b>	-24,10	18,50	-10,6500	-3,8500	-,2750
DN.SF_FM	49	1	,4675	1,31635	-1,40	5,84	<b>-,4350</b>	<b>,3400</b>	<b>1,3700</b>
DN.SF_LYSIS	50	0	,4443	1,53564	-4,65	3,98	<b>-,2508</b>	<b>,5250</b>	<b>1,2825</b>
DN.SF_SF24H	50	0	-,1552	2,05779	-5,28	6,03	<b>-1,2850</b>	<b>-,3200</b>	<b>,9225</b>
UnswitchedMemory.SF_FM	49	1	-,9000	2,56757	-9,30	2,18	<b>-1,6950</b>	<b>-,0500</b>	<b>,8950</b>
UnswitchedMemory.SF_LYSIS	50	0	-,7740	1,95282	-6,00	3,02	<b>-1,9550</b>	<b>-,4250</b>	<b>,6000</b>
UnswitchedMemory.SF_SF24H	50	0	2,0356	3,15783	-9,83	7,90	<b>,9500</b>	<b>2,6750</b>	<b>3,5475</b>
SwitchedMemoryPB.SF_FM	49	1	-,4912	3,16064	-12,97	5,40	<b>-1,2050</b>	<b>,0600</b>	<b>1,1400</b>



SwitchedMemoryPB.SF_LYSIS	50	0	,4372	1,81836	-4,29	5,00	<b>-,5625</b>	<b>,3550</b>	<b>1,3700</b>
SwitchedMemoryPB.SF_SF24H	50	0	2,2272	5,08345	-16,43	12,65	<b>,5700</b>	<b>2,5850</b>	<b>4,5575</b>
Bm1.SF_FM	46	4	,2568	1,74708	-2,63	7,38	<b>-1,1000</b>	<b>,1250</b>	<b>1,4775</b>
Bm1.SF_LYSIS	47	3	,1566	1,71160	-5,07	4,00	<b>-1,1100</b>	<b>,0300</b>	<b>1,6000</b>
Bm1.SF_SF24H	46	4	-,6139	1,38989	-5,50	1,65	<b>-1,2625</b>	<b>-,7150</b>	<b>,3150</b>
Bm2.SF_FM	46	4	<b>1,5043</b>	<b>5,24646</b>	-17,00	13,30	-1,2000	,5500	3,9250
Bm2.SF_LYSIS	47	3	<b>1,3915</b>	<b>4,72348</b>	-6,70	11,60	-1,9000	,4000	4,3000
Bm2.SF_SF24H	46	4	<b>-,4870</b>	<b>6,05408</b>	-20,00	15,90	-3,5000	-,4500	2,6000
Bm3y4.SF_FM	46	4	,1027	,48472	-1,09	1,24	<b>-,1885</b>	<b>,0565</b>	<b>,3692</b>
Bm3y4.SF_LYSIS	47	3	,0933	,45811	-,70	1,67	<b>-,2700</b>	<b>,0460</b>	<b>,3520</b>
Bm3y4.SF_SF24H	46	4	,3584	,41357	-,39	1,84	<b>,0657</b>	<b>,3380</b>	<b>,5782</b>
PreGC.SF_FM	46	4	-,7550	,90457	-3,08	2,01	<b>-1,0425</b>	<b>-,6250</b>	<b>-,2500</b>
PreGC.SF_LYSIS	47	3	-,7584	,99355	-3,14	1,18	<b>-1,3400</b>	<b>-,5800</b>	<b>-,2000</b>
PreGC.SF_SF24H	46	4	-,1270	,77393	-1,96	1,31	<b>-,5800</b>	<b>-,1250</b>	<b>,4918</b>
LateBm5.SF_FM	46	4	-,8893	2,18474	-5,72	4,33	<b>-1,9075</b>	<b>-,6350</b>	<b>,5975</b>
LateBm5.SF_LYSIS	47	3	-,3956	2,06076	-5,08	2,94	<b>-1,9800</b>	<b>,1400</b>	<b>1,0200</b>
LateBm5.SF_SF24H	46	4	-,0042	1,77014	-4,95	3,10	<b>-,3925</b>	<b>,1850</b>	<b>1,0250</b>
EarlyBm5.SF_FM	46	4	-,4387	2,54660	-3,80	12,30	<b>-1,9500</b>	<b>-,5500</b>	<b>,3550</b>
EarlyBm5.SF_LYSIS	47	3	-,6966	2,31031	-6,80	8,20	<b>-2,4400</b>	<b>-,6000</b>	<b>,4000</b>
EarlyBm5.SF_SF24H	46	4	,8491	3,94570	-4,60	17,68	<b>-1,4050</b>	<b>,1850</b>	<b>1,8125</b>

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 6:** se expresan las medias de las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (CD19, Naive, DN, Unswitched Memory, Switched Memory, Bm1, Bm2, Bm3 y 4, PreGC, late Bm5 y early Bm5) cuando se combinan el procesamiento “gold standard” con un segundo procesamiento (FM, Lysis o SF24h).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
Medias.CD19SF.FM	50	0	<b>11,4743</b>	<b>4,48597</b>	3,47	18,20	6,2638	12,7500	15,8500
Medias.CD19SF.Lysis	50	0	<b>11,9943</b>	<b>4,61491</b>	3,79	18,40	6,7713	13,0500	16,3625
Medias.CD19SF.SF24H	50	0	<b>12,3032</b>	<b>4,59413</b>	4,35	20,10	7,4012	13,2250	16,2000
Medias.NaiveSF.FM	50	0	70,2820	8,73231	51,25	79,95	<b>63,3625</b>	<b>73,8500</b>	<b>77,2750</b>
Medias.NaiveSF.Lysis	50	0	70,8340	8,07053	54,05	82,40	<b>64,8625</b>	<b>73,6250</b>	<b>77,2875</b>
Medias.NaiveSF.SF24H	50	0	72,7690	8,01659	56,90	82,85	<b>65,8375</b>	<b>76,3000</b>	<b>79,4125</b>
Medias.DNSF.FM	50	0	<b>3,8233</b>	<b>1,71841</b>	,93	6,81	1,8288	4,4100	5,1950
Medias.DNSF.Lysis	50	0	<b>3,8302</b>	<b>1,92232</b>	,87	7,98	1,8775	4,3650	5,2588
Medias.DNSF.SF24H	50	0	<b>4,1300</b>	<b>1,96561</b>	,84	7,76	2,1887	4,5600	5,7163
Medias.UnswitchedMemory SF.FM	50	0	<b>10,0884</b>	<b>6,04401</b>	2,48	24,35	4,7088	9,7125	12,9875
Medias.UnswitchedMemory SF.Lysis	50	0	<b>10,0344</b>	<b>5,59474</b>	2,72	22,65	5,2325	9,4825	12,9750
Medias.UnswitchedMemory SF.SF24h	50	0	<b>8,6296</b>	<b>4,98125</b>	1,96	19,05	3,9513	8,0675	12,4500
Medias.SwitchedMemoryPB SF.FM	50	0	11,6211	4,65850	4,58	23,60	<b>8,0138</b>	<b>11,0500</b>	<b>14,4375</b>
Medias.SwitchedMemoryPB SF.Lysis	50	0	11,1618	4,42509	5,22	23,10	<b>6,8263</b>	<b>11,1025</b>	<b>13,4625</b>
Medias.SwitchedMemoryPB SF.SF24h	50	0	10,2668	4,32734	4,62	22,35	<b>6,7225</b>	<b>9,6175</b>	<b>13,6875</b>
Medias.Bm1SF.FM	50	0	6,8629	6,56679	1,66	30,25	<b>3,4400</b>	<b>4,5925</b>	<b>7,8688</b>
Medias.Bm1SF.Lysis	50	0	6,9074	6,26187	1,66	29,80	<b>3,4325</b>	<b>4,9300</b>	<b>8,7838</b>
Medias.Bm1SF.SF24h	50	0	7,2634	6,93263	1,26	31,40	<b>3,4550</b>	<b>5,0250</b>	<b>9,5500</b>

Medias.Bm2SF.FM	50	0	<b>73,2720</b>	<b>6,67341</b>	56,70	83,80	68,3375	72,3750	79,6125
Medias.Bm2SF.Lysis	50	0	<b>73,3100</b>	<b>6,75232</b>	57,65	83,80	68,3375	72,1250	80,0000
Medias.Bm2SF.SF24h	50	0	<b>74,1880</b>	<b>7,11891</b>	56,30	83,80	69,7000	75,9250	80,3125
Medias.Bm3y4SF.FM	50	0	,5181	,40671	,00	2,17	<b>,3139</b>	<b>,4163</b>	<b>,5654</b>
Medias.Bm3y4SF.Lysis	50	0	,5215	,37397	,00	1,94	<b>,3076</b>	<b>,4423</b>	<b>,6631</b>
Medias.Bm3y4SF.SF24h	50	0	,4006	,36831	,00	1,85	<b>,2076</b>	<b>,3153</b>	<b>,4472</b>
Medias.PreGCSF.FM	50	0	<b>3,2747</b>	<b>1,67774</b>	1,09	6,23	1,6025	3,1800	4,9250
Medias.PreGCSF.Lysis	50	0	<b>3,2839</b>	<b>1,63534</b>	1,09	5,87	1,5675	3,3800	5,0688
Medias.PreGCSF.SF24h	50	0	<b>2,9858</b>	<b>1,54660</b>	1,09	6,08	1,3187	3,1375	4,1475
Medias.LateBm5SF.FM	50	0	3,3607	1,44547	,91	6,69	<b>2,1938</b>	<b>3,3450</b>	<b>4,0338</b>
Medias.LateBm5SF.Lysis	50	0	3,1375	1,31104	1,03	6,71	<b>2,2413</b>	<b>2,8325</b>	<b>3,8375</b>
Medias.LateBm5SF.SF24h	50	0	2,9535	1,45633	,98	6,89	<b>1,6788</b>	<b>2,8050</b>	<b>3,7300</b>
Medias.EarlyBm5SF.FM	50	0	<b>9,5438</b>	<b>4,27868</b>	3,87	17,85	5,2888	10,8500	12,4625
Medias.EarlyBm5SF.Lysis	50	0	<b>9,6694</b>	<b>4,50751</b>	3,61	20,20	5,1725	10,3400	12,7750
Medias.EarlyBm5SF.SF24h	50	0	<b>8,9514</b>	<b>3,69291</b>	3,22	15,55	5,4088	9,8775	11,5750

\*Distribución asimétrica.

#### 4. 1. 2. ESTUDIO DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LOS DISTINTOS FLUOROCROMOS EN CADA UNA DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TIPO B.

**Tabla 7:** se expresan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD19 en cada uno de los procesamientos de muestras utilizados (SF, FM, Lysis y SF24h). La mediana de CD19 en el procesamiento SF es de 2530.

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD19SF	50	0	2451,580	310,80377	1842,0	2896,00	<b>2383,000</b>	<b>2530,000</b>	<b>2667,500</b>
CD19FM	47	3	3041,170	972,73899	1783,0	4704,00	<b>2558,000</b>	<b>2678,000</b>	<b>4074,000</b>
CD19Lysis	47	3	3088,531	1016,7890	1810,0	4749,00	<b>2526,000</b>	<b>2702,000</b>	<b>4138,000</b>

CD19SF24h	46	4	2533,434	701,24662	1641,0	3645,00	<b>2129,500</b>	<b>2242,000</b>	<b>3298,750</b>
-----------	----	---	----------	-----------	--------	---------	-----------------	-----------------	-----------------

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 8:** se expresan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD en cada una de las subpoblaciones linfocitarias en las que este fluorocromo interviene para su detección (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory) clasificados según cada uno de los procesamientos de muestras utilizados (SF, FM, Lysis y SF24h).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
<i>CD19SF</i>	50	0	2451,580	310,80377	1842,0	2896,00	<b>2383,000</b>	<b>2530,000</b>	<b>2667,500</b>
<i>CD19FM</i>	47	3	3041,170	972,73899	1783,0	4704,00	<b>2558,000</b>	<b>2678,000</b>	<b>4074,000</b>
<i>CD19Lysis</i>	47	3	3088,531	1016,7890	1810,0	4749,00	<b>2526,000</b>	<b>2702,000</b>	<b>4138,000</b>
<i>CD19SF24h</i>	46	4	2533,434	701,24662	1641,0	3645,00	<b>2129,500</b>	<b>2242,000</b>	<b>3298,750</b>
IgD.DN.SF	50	0	67,8660	14,93221	33,10	98,20	<b>56,4500</b>	<b>68,6500</b>	<b>79,5000</b>
IgD.DN.FM	46	4	63,8348	17,33517	31,50	113,00	<b>50,4250</b>	<b>65,0000</b>	<b>74,8000</b>
IgD.DN.Lysis	47	3	80,8170	31,28324	38,60	175,00	<b>57,1000</b>	<b>76,2000</b>	<b>94,5000</b>
IgD.DN.SF24h	46	4	70,6891	15,18990	40,50	107,00	<b>55,8250</b>	<b>70,8000</b>	<b>83,7500</b>
IgD.Naive.SF	50	0	15089,06	12602,002	973,00	42567,0	<b>3535,000</b>	<b>10958,50</b>	<b>26541,50</b>
IgD.Naive.FM	46	4	14871,97	12565,812	1105,0	42661,0	<b>1379,000</b>	<b>10564,50</b>	<b>22666,75</b>
IgD.Naive.Lysis	47	3	15543,78	12825,892	1025,0	41499,0	<b>1453,000</b>	<b>11095,00</b>	<b>28020,00</b>
IgD.Naive.SF24h	46	4	12325,54	10130,622	781,00	33429,0	<b>5463,250</b>	<b>10059,50</b>	<b>16287,00</b>
IgD.Unswitched.SF	50	0	4968,580	4102,9932	524,00	14950,0	<b>2204,750</b>	<b>3259,500</b>	<b>7673,500</b>
IgD.Unswitched.FM	46	4	5253,347	4550,6468	543,00	17683,0	<b>775,2500</b>	<b>3704,500</b>	<b>7275,750</b>
IgD.Unswitched.Lysis	47	3	5398,510	4644,4014	455,00	16291,0	<b>823,0000</b>	<b>3673,000</b>	<b>7530,000</b>
IgD.Unswitched.SF24h	46	4	4319,891	3088,7080	423,00	10597,0	<b>2137,250</b>	<b>3821,000</b>	<b>7070,000</b>
IgD.Switched.SF	50	0	66,2240	14,08843	48,00	119,00	<b>56,6250</b>	<b>62,2000</b>	<b>77,3250</b>
IgD.Switched.FM	46	4	63,3696	14,95419	33,10	100,00	<b>52,4000</b>	<b>59,8000</b>	<b>70,9250</b>
IgD.Switched.Lysis	47	3	70,4106	21,56628	40,00	140,00	<b>56,8000</b>	<b>64,5000</b>	<b>81,7000</b>

IgD.Switched.SF24h	46	4	62,9826	13,98303	37,80	93,70	<b>54,1750</b>	<b>59,9500</b>	<b>72,9000</b>
--------------------	----	---	---------	----------	-------	-------	----------------	----------------	----------------

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 9:** se expresan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD27 en cada una de las subpoblaciones linfocitarias en las que este fluorocromo interviene para su detección (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory) clasificados según cada uno de los procesamientos de muestras utilizados (SF, FM, Lysis y SF24h).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD27.DN.SF	50	0	<b>218,0320</b>	<b>65,83410</b>	41,00	328,00	163,7500	224,0000	271,7500
CD27.DN.FM	46	4	<b>206,6065</b>	<b>76,72877</b>	58,60	384,00	155,7500	197,5000	269,7500
CD27.DN.Lysis	47	3	<b>211,9787</b>	<b>81,21181</b>	55,50	386,00	148,0000	203,0000	264,0000
CD27.DN.SF24h	46	4	<b>203,6717</b>	<b>63,29719</b>	83,90	306,00	146,7500	193,5000	256,2500
CD27.Naive.SF	50	0	<b>116,9120</b>	<b>57,37549</b>	45,90	258,00	64,5000	100,5000	176,2500
CD27.Naive.FM	46	4	<b>103,8367</b>	<b>76,22611</b>	3,98	284,00	30,4750	89,8500	163,7500
CD27.Naive.Lysis	47	3	<b>81,3140</b>	<b>45,72517</b>	8,79	181,00	26,9000	90,5000	113,0000
CD27.Naive.SF24h	46	4	<b>35,2893</b>	<b>22,40118</b>	1,10	87,90	18,0250	32,2500	52,1250
CD27.Unswitched.SF	50	0	<b>2685,000</b>	<b>545,88008</b>	1775,0	3726,00	2174,250	2840,000	3041,000
CD27.Unswitched.FM	46	4	<b>2739,826</b>	<b>534,10275</b>	1969,0	4370,00	2320,500	2740,000	2982,250
CD27.Unswitched.Lysis	47	3	<b>2872,914</b>	<b>638,69472</b>	1727,0	4283,00	2348,000	2896,000	3271,000
CD27.Unswitched.SF24h	46	4	<b>2353,630</b>	<b>525,33948</b>	1395,0	3348,00	1814,500	2503,500	2815,000
CD27.Switched.SF	50	0	4023,400	739,52169	1831,0	5592,00	<b>3483,500</b>	<b>4165,500</b>	<b>4528,750</b>
CD27.Switched.FM	46	4	3968,652	734,92495	2464,0	5209,00	<b>3720,000</b>	<b>3999,500</b>	<b>4489,750</b>
CD27.Switched.Lysis	47	3	4210,085	636,51069	2581,0	5278,00	<b>3863,000</b>	<b>4284,000</b>	<b>4561,000</b>
CD27.Switched.SF24h	46	4	3267,934	716,01606	2162,0	5317,00	<b>2708,750</b>	<b>3234,000</b>	<b>3725,500</b>

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 10:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD19 cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento "gold standard" (SF).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD19.SF_FM	47	3	-567,5106	770,04861	-1937,00	408,0	<b>-1530,00</b>	<b>-131,0000</b>	<b>-47,0000</b>
CD19.SF_LYSIS	47	3	-614,8723	812,60014	-1935,00	105,0	<b>-1613,00</b>	<b>-111,0000</b>	<b>-14,0000</b>
CD19.SF_SF24H	46	4	-46,5217	547,61011	-1095,00	515,0	<b>-437,750</b>	<b>231,5000</b>	<b>343,7500</b>

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 11:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento "gold standard" (SF), clasificados según las subpoblaciones linfocitarias (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
IgD.DN.SF_FM	46	4	4,5913	17,52560	-30,70	53,10	<b>-4,4250</b>	<b>5,4500</b>	<b>14,2750</b>
IgD.DN.SF_LYSIS	47	3	-12,6681	33,61933	-119,60	46,00	<b>-23,1000</b>	<b>-8,8000</b>	<b>8,0000</b>
IgD.DN.SF_SF24H	46	4	-2,8891	17,60994	-36,30	43,30	<b>-17,0750</b>	<b>-5,7000</b>	<b>10,0250</b>
IgD.Naive.SF_FM	46	4	54,1304	2552,7762	-3219,0	15176,0	<b>-655,750</b>	<b>-150,0000</b>	<b>403,0000</b>
IgD.Naive.SF_LYSIS	47	3	-304,5106	1042,9591	-3266,0	2133,00	<b>-999,000</b>	<b>-155,0000</b>	<b>94,0000</b>
IgD.Naive.SF_SF24H	46	4	3223,000	3505,4431	-1304,0	12835,0	<b>483,2500</b>	<b>2051,500</b>	<b>5596,250</b>
IgD.Unswitched.SF_FM	46	4	-242,4565	1158,0244	-3710,0	4626,00	<b>-487,500</b>	<b>-123,5000</b>	<b>51,0000</b>
IgD.Unswitched.SF_LYSIS	47	3	-325,6809	934,12922	-4793,0	821,00	<b>-494,000</b>	<b>-65,0000</b>	<b>92,0000</b>
IgD.Unswitched.SF_SF24H	46	4	851,6304	1442,3114	-1104,0	5158,00	<b>15,2500</b>	<b>140,5000</b>	<b>1743,500</b>
IgD.Switched.SF_FM	46	4	1,2130	10,78764	-27,80	24,60	<b>-4,0250</b>	<b>,9000</b>	<b>5,7750</b>
IgD.Switched.SF_LYSIS	47	3	-5,5085	18,59184	-55,50	39,40	<b>-13,6000</b>	<b>-1,3000</b>	<b>4,4000</b>
IgD.Switched.SF_SF24H	46	4	2,1783	14,69025	-27,80	38,70	<b>-6,6500</b>	<b>,1000</b>	<b>10,1250</b>

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 12:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD27 cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento “gold standard” (SF), clasificados según las subpoblaciones linfocitarias (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD27.DN.SF_FM	46	4	10,8130	94,85883	-226,00	209,80	<b>-36,5000</b>	<b>11,0000</b>	<b>78,2500</b>
CD27.DN.SF_LYSIS	47	3	5,6872	102,70485	-291,70	152,00	<b>-56,0000</b>	<b>7,0000</b>	<b>88,0000</b>
CD27.DN.SF_SF24H	46	4	14,1826	64,60264	-156,70	121,00	<b>-25,0000</b>	<b>31,0000</b>	<b>59,2500</b>
CD27.Naive.SF_FM	46	4	12,9807	57,36604	-127,00	138,60	<b>-9,5000</b>	<b>17,5500</b>	<b>42,9250</b>
CD27.Naive.SF_LYSIS	47	3	36,6774	32,96081	-15,90	144,00	<b>18,0000</b>	<b>31,5000</b>	<b>49,8000</b>
CD27.Naive.SF_SF24H	46	4	84,2672	48,93413	29,20	208,40	<b>44,4900</b>	<b>65,1000</b>	<b>130,5000</b>
CD27.Unswitched.SF_FM	46	4	<b>-38,7174</b>	<b>325,09716</b>	-765,00	931,00	-253,000	-112,5000	175,2500
CD27.Unswitched.SF_LYSIS	47	3	<b>-153,4681</b>	<b>351,49302</b>	-1013,0	593,00	-360,000	-102,0000	98,0000
CD27.Unswitched.SF_SF24H	46	4	<b>358,2609</b>	<b>272,83845</b>	-318,00	1209,00	237,0000	400,5000	487,0000
CD27.Switched.SF_FM	46	4	<b>148,3478</b>	<b>623,02621</b>	-1357,0	1590,00	-291,000	240,0000	524,5000
CD27.Switched.SF_LYSIS	47	3	<b>-92,1064</b>	<b>523,46165</b>	-1321,0	1052,00	-385,000	-98,0000	266,0000
CD27.Switched.SF_SF24H	46	4	<b>840,0435</b>	<b>665,62435</b>	-865,00	2883,00	563,2500	775,0000	1174,250

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 13:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD38 cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento “gold standard” (SF), clasificados según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD38BM1_SF	49	1	203,3061	56,22692	100,00	392,00	<b>172,0000</b>	<b>199,0000</b>	<b>219,5000</b>
CD38BM1_FM	46	4	201,6522	45,83604	111,00	337,00	<b>176,0000</b>	<b>194,0000</b>	<b>221,7500</b>

CD38BM1_LYSIS	47	3	<b>204,4894</b>	<b>55,94674</b>	102,00	374,00	164,0000	206,0000	226,0000
CD38BM1_SF24h	46	4	<b>184,1130</b>	<b>45,95017</b>	87,00	285,00	161,7500	183,0000	205,2500
CD38BM2_SF	49	1	2456,714	477,77605	1771,00	3429,00	<b>2118,500</b>	<b>2334,000</b>	<b>2753,500</b>
CD38BM2_FM	46	4	<b>2571,695</b>	<b>467,30228</b>	1774,00	3381,00	2144,500	2454,500	3081,250
CD38BM2_Lysis	47	3	<b>2626,000</b>	<b>483,20227</b>	1826,00	3475,00	2157,000	2628,000	3074,000
CD38BM2_SF24h	46	4	<b>2457,956</b>	<b>458,11473</b>	1762,00	3287,00	2053,500	2388,500	2877,750
CD38BM2P_SF	49	1	<b>11790,46</b>	<b>1202,3013</b>	9185,00	15462,0	10800,50	11651,00	12467,00
CD38BM2P_FM	46	4	<b>11718,00</b>	<b>909,80264</b>	9270,00	15080,0	11141,00	11681,00	12276,50
CD38BM2P_Lysis	47	3	<b>11659,57</b>	<b>1047,2647</b>	9671,00	14068,0	10798,00	11637,00	12352,00
CD38BM2P_SF24h	46	4	<b>11311,80</b>	<b>853,21996</b>	9740,00	13672,0	10650,00	11303,50	11896,25
CD38BM3y4_SF	49	1	28245,08	16781,985	11628,0	74795,0	<b>17389,50</b>	<b>22266,00</b>	<b>30522,50</b>
CD38BM3y4_FM	46	4	22190,82	13401,746	6689,00	67782,0	<b>15397,25</b>	<b>18960,00</b>	<b>23963,25</b>
CD38BM3y4_Lysis	46	4	24785,60	16364,547	7626,00	76555,0	<b>15418,50</b>	<b>18877,50</b>	<b>26192,50</b>
CD38BM3y4_SF24h	45	5	<b>17288,84</b>	<b>6755,0093</b>	6875,00	31021,0	12279,00	14798,00	22670,50
CD38EarlyBM5_SF	49	1	<b>2162,857</b>	<b>261,81609</b>	1617,00	2551,00	2051,000	2189,000	2355,000
CD38EarlyBM5_FM	46	4	<b>2187,826</b>	<b>300,17701</b>	1648,00	2659,00	1866,250	2307,500	2416,250
CD38EarlyBM5_Lysis	47	3	<b>2218,255</b>	<b>298,36791</b>	1559,00	2881,00	2031,000	2235,000	2469,000
CD38EarlyBM5_SF24h	46	4	<b>2116,782</b>	<b>285,43152</b>	1599,00	2582,00	1895,250	2152,000	2342,000
CD38LateBM5_SF	49	1	161,5265	37,37726	79,80	281,00	<b>138,0000</b>	<b>149,0000</b>	<b>183,0000</b>
CD38LateBM5_FM	46	4	178,2609	43,13155	108,00	302,00	<b>145,0000</b>	<b>176,0000</b>	<b>199,7500</b>
CD38LateBM5_Lysis	47	3	<b>177,5830</b>	<b>36,97837</b>	76,00	255,00	152,0000	175,0000	211,0000
CD38LateBM5_SF24h	46	4	<b>179,0652</b>	<b>34,31644</b>	118,00	252,00	150,7500	172,0000	208,0000

\*Distribución asimétrica.



**Tabla 14:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento "gold standard" (SF), clasificados según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
IgDBM1_SF	49	1	9203,449	6056,6256	2225,00	23735,0	<b>3339,500</b>	<b>7853,000</b>	<b>12760,00</b>
IgDBM1_FM	46	4	9513,934	6334,3692	2373,00	26503,0	<b>3038,000</b>	<b>8335,500</b>	<b>12697,75</b>
IgDBM1_Lysis	47	3	9939,872	7009,3611	2265,00	27327,0	<b>2715,000</b>	<b>8766,000</b>	<b>12987,00</b>
IgDBM1_SF24h	46	4	8595,587	5775,3080	2086,00	23797,0	<b>4884,000</b>	<b>7839,000</b>	<b>9983,250</b>
IgDBM2_SF	49	1	14519,53	11538,139	1974,00	38138,0	<b>3463,000</b>	<b>10782,00</b>	<b>22342,00</b>
IgDBM2_FM	46	4	14442,60	11319,857	2143,00	39850,0	<b>2307,250</b>	<b>10925,50</b>	<b>21728,75</b>
IgDBM2_Lysis	47	3	14565,12	11196,452	1986,00	38818,0	<b>2464,000</b>	<b>10863,00</b>	<b>21780,00</b>
IgDBM2_SF24h	46	4	12160,58	9465,1902	1934,00	32516,0	<b>5848,500</b>	<b>10345,00</b>	<b>13711,50</b>
IgDBM2P_SF	49	1	17607,26	14159,257	2153,00	44933,0	<b>4097,000</b>	<b>12059,00</b>	<b>26189,00</b>
IgDBM2P_FM	46	4	<b>18924,78</b>	<b>14764,088</b>	2120,00	46649,0	2731,000	13493,00	29854,25
IgDBM2P_Lysis	47	3	<b>18747,78</b>	<b>14830,896</b>	2223,00	47197,0	3517,000	12745,00	28940,00
IgDBM2P_SF24h	46	4	15552,69	12404,309	2047,00	41120,0	<b>5943,250</b>	<b>12334,00</b>	<b>22123,25</b>
IgDBM3y4_SF	49	1	166,9939	134,17870	22,10	514,00	<b>88,7000</b>	<b>106,0000</b>	<b>176,0000</b>
IgDBM3y4_FM	46	4	190,2087	198,33748	14,80	998,00	<b>65,8250</b>	<b>101,5000</b>	<b>216,2500</b>
IgDBM3y4_Lysis	46	4	221,2567	187,06140	3,91	697,00	<b>103,7500</b>	<b>153,0000</b>	<b>304,2500</b>
IgDBM3y4_SF24h	45	5	257,2267	217,16948	15,70	880,00	<b>93,6000</b>	<b>148,0000</b>	<b>445,0000</b>
IgDEarlyBM5_SF	49	1	168,1449	127,72793	61,80	455,00	<b>89,4000</b>	<b>107,0000</b>	<b>200,5000</b>
IgDEarlyBM5_FM	45	5	177,3800	128,94556	63,70	455,00	<b>86,5500</b>	<b>110,0000</b>	<b>227,0000</b>
IgDEarlyBM5_Lysis	47	3	182,1702	131,47119	67,10	480,00	<b>93,1000</b>	<b>128,0000</b>	<b>216,0000</b>
IgDEarlyBM5_SF24h	46	4	170,0717	123,80871	55,00	457,00	<b>96,8000</b>	<b>113,5000</b>	<b>210,7500</b>
IgDLateBM5_SF	49	1	103,7061	35,92814	22,20	239,00	<b>82,0000</b>	<b>96,1000</b>	<b>119,0000</b>
IgDLateBM5_FM	46	4	<b>101,4413</b>	<b>28,69049</b>	60,40	176,00	79,2250	103,0000	119,5000

IgDLateBM5_Lysis	47	3	<b>111,2957</b>	<b>29,08119</b>	47,30	162,00	92,2000	114,0000	134,0000
IgDLateBM5_SF24h	46	4	<b>111,4478</b>	<b>28,21790</b>	61,00	182,00	91,2000	106,0000	134,2500

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 15:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD38 cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento “gold standard” (SF), clasificados según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
CD38BM1.SF_FM	45	5	-4,7333	53,55600	-134,00	209,00	<b>-29,5000</b>	<b>-6,0000</b>	<b>27,5000</b>
CD38BM1.SF_LYSIS	46	4	<b>-7,1957</b>	<b>59,80027</b>	-189,00	179,00	-28,2500	-7,0000	16,5000
CD38BM1.SF_SF24H	45	5	14,1733	54,54390	-94,00	298,00	<b>-12,0000</b>	<b>9,0000</b>	<b>37,5000</b>
CD38BM2.SF_FM	45	5	<b>-113,6000</b>	<b>215,36559</b>	-542,00	449,00	-234,5000	-46,0000	12,5000
CD38BM2.SF_LYSIS	46	4	-173,4130	197,66386	-615,00	82,00	<b>-333,7500</b>	<b>-131,0000</b>	<b>-16,0000</b>
CD38BM2.SF_SF24H	45	5	-23,5556	186,31102	-482,00	263,00	<b>-158,0000</b>	<b>30,0000</b>	<b>111,5000</b>
CD38BM2P.SF_FM	45	5	<b>134,3556</b>	<b>1208,4278</b>	-4382,00	2961,00	-443,0000	142,0000	641,0000
CD38BM2P.SF_LYSIS	46	4	<b>191,8043</b>	<b>1099,0864</b>	-2621,00	3659,00	-322,0000	164,5000	793,0000
CD38BM2P.SF_SF24H	45	5	553,8889	1156,9590	-1671,00	4314,00	-176,0000	<b>477,0000</b>	<b>1074,5000</b>
CD38BM3y4.SF_FM	45	5	6618,866	16852,197	-23565,0	64940,0	-3286,000	<b>2683,000</b>	<b>11227,00</b>
CD38BM3y4.SF_LYSIS	45	5	3711,222	15223,516	-16978,0	63426,0	-3282,500	<b>892,0000</b>	<b>5784,000</b>
CD38BM3y4.SF_SF24H	44	6	12151,95	16394,800	-11538,0	58615,0	2761,500	<b>6698,500</b>	<b>14607,00</b>
CD38EarlyBM5.SF_FM	45	5	-33,5333	231,99663	-569,00	899,00	-144,0000	<b>-57,0000</b>	<b>42,5000</b>
CD38EarlyBM5.SF_LYSIS	46	4	<b>-64,4348</b>	<b>203,54095</b>	-618,00	441,00	-172,5000	-83,0000	42,2500
CD38EarlyBM5.SF_SF24H	45	5	<b>27,6000</b>	<b>164,89368</b>	-257,00	449,00	-86,5000	-4,0000	128,5000
CD38LateBM5.SF_FM	45	5	<b>-20,9156</b>	<b>53,56154</b>	-146,00	104,00	-54,5000	-10,0000	9,5000
CD38LateBM5.SF_LYSIS	46	4	<b>-20,2087</b>	<b>42,29295</b>	-156,20	72,00	-43,2500	-17,5000	6,4000
CD38LateBM5.SF_SF24H	45	5	<b>-21,6489</b>	<b>37,64128</b>	-94,00	67,00	-52,5000	-22,0000	2,5000

\*Distribución asimétrica.

**Tabla 16:** se expresan las diferencias encontradas en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD cuando se comparan los procesamientos de la muestra FM, Lysis y SF24h con el procesamiento “gold standard” (SF), clasificados según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5).

	N		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Percentiles(*)		
	Válidos	Perdidos					25	Mediana	75
IgDBM1.SF_FM	45	5	<b>-377,7333</b>	<b>1292,4258</b>	-5086,00	3529,00	-914,5000	-180,0000	134,0000
IgDBM1.SF_LYSIS	46	4	-678,0217	1603,3038	-6589,00	1892,00	<b>-924,2500</b>	<b>-109,0000</b>	<b>157,5000</b>
IgDBM1.SF_SF24H	45	5	801,4222	1996,6219	-4011,00	6847,00	<b>77,0000</b>	<b>451,0000</b>	<b>1246,0000</b>
IgDBM2.SF_FM	45	5	<b>31,4000</b>	<b>1342,3693</b>	-2880,00	2625,00	-584,0000	150,0000	1026,5000
IgDBM2.SF_LYSIS	46	4	<b>61,5870</b>	<b>1136,1799</b>	-2433,00	2982,00	-553,0000	-44,5000	888,0000
IgDBM2.SF_SF24H	45	5	2721,888	3182,2848	-1104,00	11170,0	<b>225,0000</b>	<b>1397,0000</b>	<b>5288,5000</b>
IgDBM2P.SF_FM	45	5	-1130,066	3162,8339	-12783,0	4541,00	<b>-2035,5000</b>	<b>-321,0000</b>	<b>506,0000</b>
IgDBM2P.SF_LYSIS	46	4	-754,7609	2867,7130	-11323,0	4564,00	<b>-2201,7500</b>	<b>-345,5000</b>	<b>373,0000</b>
IgDBM2P.SF_SF24H	45	5	2733,088	3299,6647	-2241,00	9652,00	<b>164,5000</b>	<b>1449,0000</b>	<b>5539,0000</b>
IgDBM3y4.SF_FM	45	5	-21,7711	162,66543	-975,90	128,70	<b>-50,0500</b>	<b>7,0000</b>	<b>41,0000</b>
IgDBM3y4.SF_LYSIS	45	5	-53,4358	139,99664	-650,90	91,60	<b>-68,4500</b>	<b>-40,0000</b>	<b>14,1500</b>
IgDBM3y4.SF_SF24H	44	6	-78,9318	156,68488	-668,00	95,40	<b>-113,1500</b>	<b>-46,7000</b>	<b>8,6000</b>
IgDEarlyBM5.SF_FM	44	6	-2,5364	34,57686	-143,50	80,60	<b>-18,7500</b>	<b>,3500</b>	<b>20,9000</b>
IgDEarlyBM5.SF_LYSIS	46	4	<b>-12,0022</b>	<b>35,58006</b>	-115,20	76,60	-30,8000	-12,9500	13,2500
IgDEarlyBM5.SF_SF24H	45	5	<b>-5,2333</b>	<b>23,46102</b>	-55,00	47,50	-24,4000	-4,0000	8,7000
IgDLateBM5.SF_FM	45	5	1,7800	25,43778	-81,70	66,00	<b>-10,9000</b>	<b>2,0000</b>	<b>17,6500</b>
IgDLateBM5.SF_LYSIS	46	4	<b>-9,1739</b>	<b>28,67113</b>	-63,70	55,00	-29,3500	-8,0000	12,0000
IgDLateBM5.SF_SF24H	45	5	-10,0422	27,41574	-70,60	98,00	<b>-27,8500</b>	<b>-15,0000</b>	<b>4,0500</b>

\*Distribución asimétrica.

## 4.2. ESTADÍSTICA INFERENCIAL.

### 4.2.1. ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TIPO B.

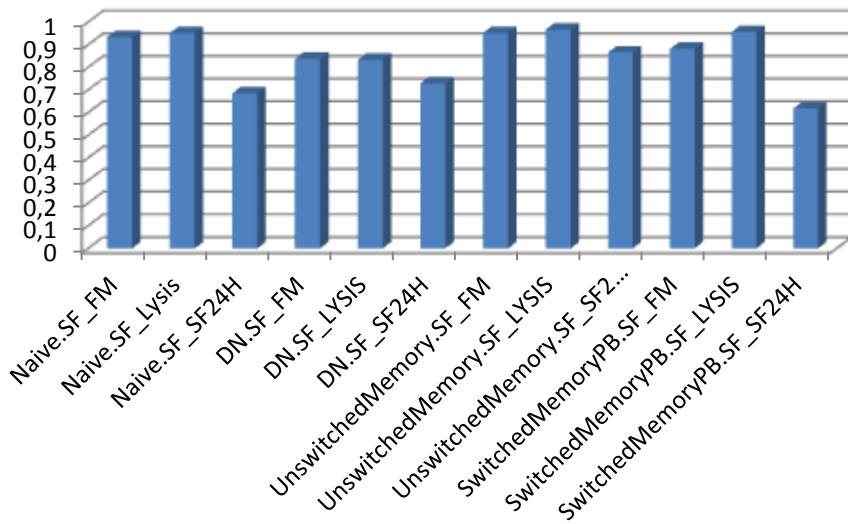
**Tabla 17:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas (DN, Naive, Unswitched memory, Switched memory, Bm1, Bm2, Bm3y4, PreGC, LateBm5 y EarlyBm5) cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación Intraclase	Sig.
Naive.SF_FM	0,931	0,932	0,00
Naive.SF_Lysis	0,952	0,951	0,00
Naive.SF_SF24H	0,738	0,685	0,00
DN.SF_FM	0,851	0,838	0,00
DN.SF_LYSIS	0,84	0,832	0,00
DN.SF_SF24H	0,726	0,729	0,00
UnswitchedMemory.SF_FM	0,955	0,951	0,00
UnswitchedMemory.SF_LYSIS	0,97	0,966	0,00
UnswitchedMemory.SF_SF24H	0,9	0,865	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_FM	0,882	0,881	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_LYSIS	0,958	0,956	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_SF24H	0,655	0,618	0,00
Bm1.SF_FM	0,983	0,983	0,00
Bm1.SF_LYSIS	0,982	0,982	0,00
Bm1.SF_SF24H	0,99	0,989	0,00
Bm2.SF_FM	0,842	0,834	0,00
Bm2.SF_LYSIS	0,874	0,867	0,00
Bm2.SF_SF24H	0,813	0,815	0,00
Bm3y4.SF_FM	0,638	0,633	0,00
Bm3y4.SF_LYSIS	0,613	0,608	0,001
Bm3y4.SF_SF24H	0,694	0,567	0,00
PreGC.SF_FM	0,925	0,881	0,00
PreGC.SF_LYSIS	0,906	0,86	0,00
PreGC.SF_SF24H	0,932	0,932	0,00
LateBm5.SF_FM	0,469	0,435	0,018
LateBm5.SF_LYSIS	0,417	0,413	0,00
LateBm5.SF_SF24H	0,646	0,651	0,00
EarlyBm5.SF_FM	0,91	0,909	0,00
EarlyBm5.SF_LYSIS	0,937	0,933	0,00
EarlyBm5.SF_SF24H	0,706	0,701	0,00

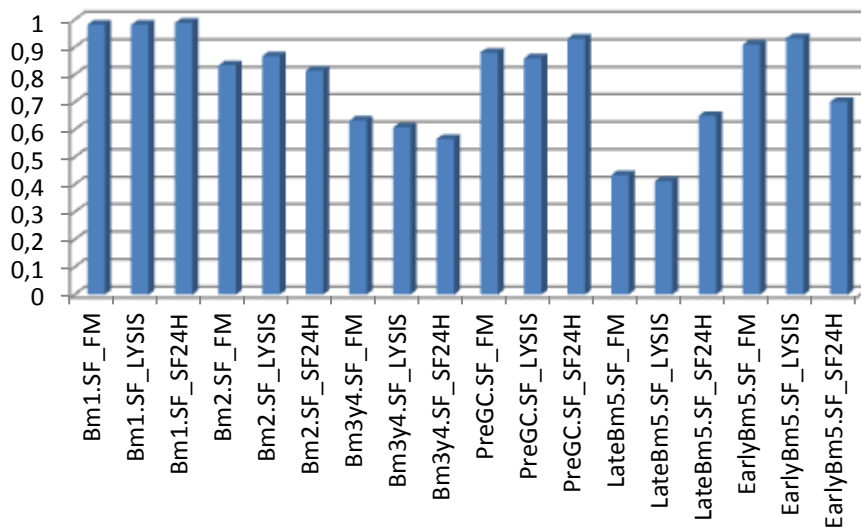
**Tabla 18:** se observan resaltados en negrilla y desplazado hacia la izquierda de la celda, los valores del coeficiente de correlación intraclase más alto para cada una de las subpoblaciones linfocitarias (DN, Naive, Unswitched memory, Switched memory, Bm1, Bm2, Bm3y4, PreGC, LateBm5 y EarlyBm5) agrupados según el procesamiento de muestra utilizado..

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
Naive.SF_FM	0,932	0,00
Naive.SF_Lysis	<b>0,951</b>	0,00
Naive.SF_SF24H	0,685	0,00
DN.SF_FM	<b>0,838</b>	0,00
DN.SF_LYSIS	0,832	0,00
DN.SF_SF24H	0,729	0,00
UnswitchedMemory.SF_FM	0,951	0,00
UnswitchedMemory.SF_LYSIS	<b>0,966</b>	0,00
UnswitchedMemory.SF_SF24H	0,865	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_FM	0,881	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_LYSIS	<b>0,956</b>	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_SF24H	0,618	0,00
Bm1.SF_FM	0,983	0,00
Bm1.SF_LYSIS	0,982	0,00
Bm1.SF_SF24H	<b>0,989</b>	0,00
Bm2.SF_FM	0,834	0,00
Bm2.SF_LYSIS	<b>0,867</b>	0,00
Bm2.SF_SF24H	0,815	0,00
Bm3y4.SF_FM	<b>0,633</b>	0,00
Bm3y4.SF_LYSIS	0,608	0,001
Bm3y4.SF_SF24H	0,567	0,00
PreGC.SF_FM	0,881	0,00
PreGC.SF_LYSIS	0,86	0,00
PreGC.SF_SF24H	<b>0,932</b>	0,00
LateBm5.SF_FM	0,435	0,018
LateBm5.SF_LYSIS	0,413	0,00
LateBm5.SF_SF24H	<b>0,651</b>	0,00
EarlyBm5.SF_FM	0,909	0,00
EarlyBm5.SF_LYSIS	<b>0,933</b>	0,00
EarlyBm5.SF_SF24H	0,701	0,00

**Gráfico 1:** En el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Naive, DN, Unswitched memory y Switched memory) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba “gold standard” (Sangre Fresca representada con las siglas SF).



**Gráfico 2:** En el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Bm1, Bm2, Bm3y4, PreGC, LateBM5 y EarlyBM5) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba “gold standard” (Sangre Fresca representada con la sigla SF).



**Tabla 19:** se observa el coeficiente de correlación intraclase, ordenado de mayor a menor, incluyendo las subpoblaciones linfocitarias (Clasificación EuroClass y Bmature). De este modo, se ha resaltado con fondo gris, aquellos estudios que han alcanzado un resultado >0,9 lo cual indica una correlación MUY BUENA. Por otro lado, en verde, se han resultado los resultados que han obtenido una correlación BUENA (coeficiente de correlación intraclase comprendido entre 0,71-0,90).

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
Bm1.SF_SF24H	0,989	0,00
Bm1.SF_FM	0,983	0,00
Bm1.SF_LYSIS	0,982	0,00
UnswitchedMemory.SF_LYSIS	0,966	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_LYSIS	0,956	0,00
Naive.SF_Lysis	0,951	0,00
UnswitchedMemory.SF_FM	0,951	0,00
EarlyBm5.SF_LYSIS	0,933	0,00
Naive.SF_FM	0,932	0,00
PreGC.SF_SF24H	0,932	0,00
EarlyBm5.SF_FM	0,909	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_FM	0,881	0,00
PreGC.SF_FM	0,881	0,00
Bm2.SF_LYSIS	0,867	0,00
UnswitchedMemory.SF_SF24H	0,865	0,00
PreGC.SF_LYSIS	0,86	0,00
DN.SF_FM	0,838	0,00
Bm2.SF_FM	0,834	0,00
DN.SF_LYSIS	0,832	0,00
Bm2.SF_SF24H	0,815	0,00
DN.SF_SF24H	0,729	0,00
EarlyBm5.SF_SF24H	0,701	0,00
Naive.SF_SF24H	0,685	0,00
LateBm5.SF_SF24H	0,651	0,00
Bm3y4.SF_FM	0,633	0,00
SwitchedMemoryPB.SF_SF24H	0,618	0,00
Bm3y4.SF_LYSIS	0,608	0,001
Bm3y4.SF_SF24H	0,567	0,00
LateBm5.SF_FM	0,435	0,018
LateBm5.SF_LYSIS	0,413	0,00

**Tabla 20:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de las subpoblaciones linfocitarias tipo B según la Clasificación EuroClass, la Clasificación Bmature y sumando los resultados de ambas clasificaciones (EuroClass + Bmature), cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación Intraclase	Sig.
<b>Clasif. Euroclass.SF_FM</b>	0,997	0,997	0
<b>Clasif. Euroclass.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>Clasif. Euroclass.SF_SF24h</b>	0,99	0,99	0
<b>Clasif. Bmature.SF_FM</b>	0,997	0,997	0
<b>Clasif. Bmature.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>Clasif. Bmature.SF_SF24h</b>	0,996	0,996	0
<b>Clasif. Euroclass+Bmature.SF_FM</b>	0,997	0,997	0
<b>Clasif. Euroclass+Bmature.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>Clasif. Euroclass+Bmature.SF_SF24h</b>	0,993	0,993	0



#### 4.2.2. ESTUDIO DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LOS DISTINTOS FLUOROCROMOS EN CADA UNA DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TIPO B.

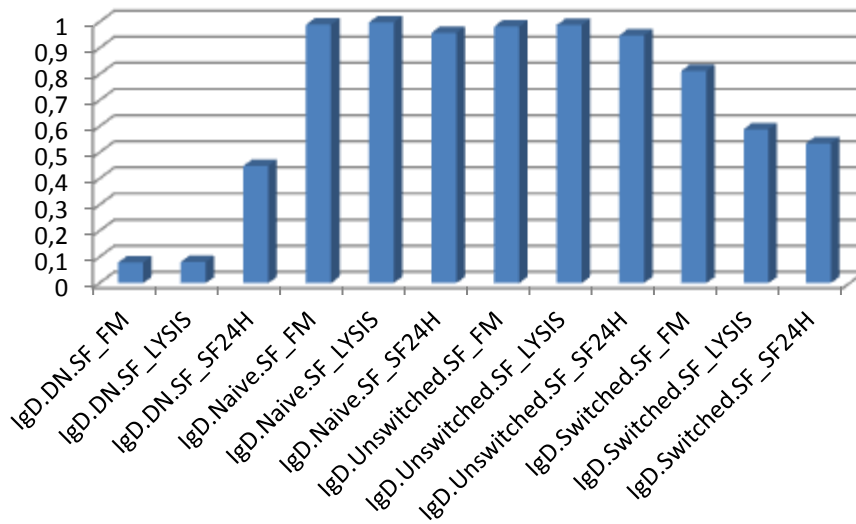
**Tabla 21:** se observan los valores de Alfa de Cronbach, matriz de correlación interelementos y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de las intensidades de los fluorocromos CD19, IgD y CD27 en cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory) cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación Intraclase	Sig.
CD19.SF_FM	0,601	0,498	0,001
CD19.SF_LYSIS	0,586	0,477	0,002
CD19.SF_SF24H	0,651	0,654	0
IgD.DN.SF_FM	0,08	0,079	0
IgD.DN.SF_LYSIS	0,09	0,081	0,375
IgD.DN.SF_SF24H	0,451	0,449	0,024
IgD.Naive.SF_FM	0,99	0,99	0
IgD.Naive.SF_LYSIS	0,998	0,998	0
IgD.Naive.SF_SF24H	0,976	0,958	0
IgD.Unswitched.SF_FM	0,982	0,982	0
IgD.Unswitched.SF_LYSIS	0,989	0,988	0
IgD.Unswitched.SF_SF24H	0,96	0,948	0
IgD.Switched.SF_FM	0,811	0,813	0
IgD.Switched.SF_LYSIS	0,604	0,589	0,001
IgD.Switched.SF_SF24H	0,535	0,535	0,006
CD27.DN.SF_FM	0,175	0,176	0,261
CD27.DN.SF_LYSIS	0,005	0,005	0,494
CD27.DN.SF_SF24H	0,651	0,645	0
CD27.Naive.SF_FM	0,785	0,78	0
CD27.Naive.SF_LYSIS	0,892	0,789	0
CD27.Naive.SF_SF24H	0,565	0,248	0,003
CD27.Unswitched.SF_FM	0,897	0,898	0
CD27.Unswitched.SF_LYSIS	0,903	0,889	0
CD27.Unswitched.SF_SF24H	0,93	0,832	0
CD27.Switched.SF_FM	0,745	0,739	0
CD27.Switched.SF_Lysis	0,797	0,796	0
CD27.Switched.SF_SF24H	0,685	0,458	0

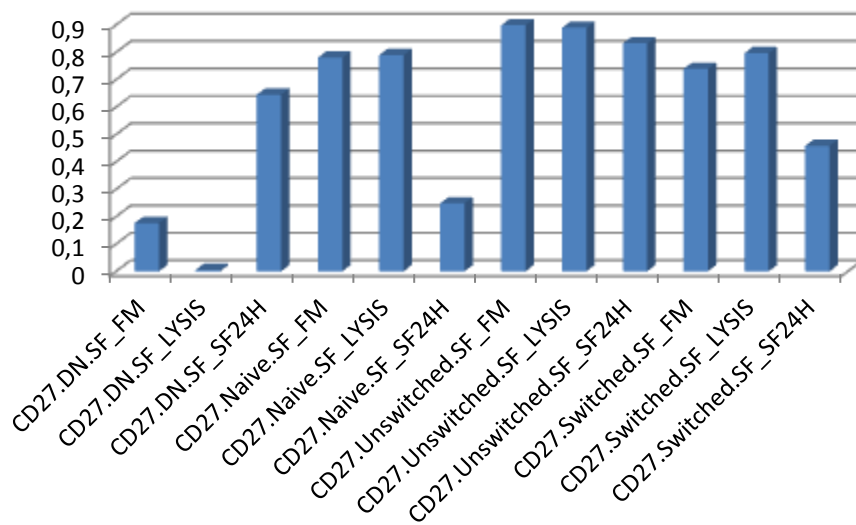
**Tabla 22:** se observa resaltado en negrilla y desplazado hacia la izquierda de la celda, el valor del coeficiente de correlación intraclase más alto para cada uno de los fluorocromos estudiados (CD 19, IgD y CD27) distribuidos según las subpoblaciones linfocitarias (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory) agrupados según el procesamiento de muestra utilizado.

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
CD19.SF_FM	0,498	0,001
CD19.SF_LYSIS	0,477	0,002
<b>CD19.SF_SF24H</b>	<b>0,654</b>	0,00
IgD.DN.SF_FM	0,079	0,00
<b>IgD.DN.SF_LYSIS</b>	<b>0,081</b>	0,375
IgD.DN.SF_SF24H	0,449	0,024
IgD.Naive.SF_FM	0,99	0,00
<b>IgD.Naive.SF_LYSIS</b>	<b>0,998</b>	0,00
IgD.Naive.SF_SF24H	0,958	0,00
IgD.Unswitched.SF_FM	0,982	0,00
<b>IgD.Unswitched.SF_LYSIS</b>	<b>0,988</b>	0,00
IgD.Unswitched.SF_SF24H	0,948	0,00
<b>IgD.Switched.SF_FM</b>	<b>0,813</b>	0,00
IgD.Switched.SF_LYSIS	0,589	0,001
IgD.Switched.SF_SF24H	0,535	0,006
CD27.DN.SF_FM	0,176	0,261
CD27.DN.SF_LYSIS	0,005	0,494
<b>CD27.DN.SF_SF24H</b>	<b>0,645</b>	0,00
CD27.Naive.SF_FM	0,78	0,00
<b>CD27.Naive.SF_LYSIS</b>	<b>0,789</b>	0,00
CD27.Naive.SF_SF24H	0,248	0,003
<b>CD27.Unswitched.SF_FM</b>	<b>0,898</b>	0,00
CD27.Unswitched.SF_LYSIS	0,889	0,00
CD27.Unswitched.SF_SF24H	0,832	0,00
CD27.Switched.SF_FM	0,739	0,00
<b>CD27.Switched.SF_LYSIS</b>	<b>0,796</b>	0,00
CD27.Switched.SF_SF24H	0,458	0,00

**Gráfico 3:** en el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Naive, DN, Unswiched memory y Switched memory) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba “gold standard” (Sangre Fresca representada con las siglas SF).



**Gráfico 4:** en el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD27 en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Naive, DN, Unswiched memory y Switched memory) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba “gold standard” (Sangre Fresca representada con las siglas SF).



**Tabla 23:** se observa el coeficiente de correlación intraclase (ordenado de mayor a menor en) el estudio de la intensidad de fluorescencia de CD19, IgD y CD27; fluorocromos utilizados para la identificación de las 4 subpoblaciones (Naive, DN, Swiched memory y Unswiched memory). De este modo, se ha resaltado con fondo gris, aquellos estudios que han alcanzado un resultado >0,9 lo cual indica una correlación MUY BUENA. Por otro lado, en verde, se han resaltado los estudios que han obtenido una correlación BUENA (coeficiente de correlación intraclase comprendido entre 0,71-0,90).

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
CD19.SF_FM	0,998	0,001
CD19.SF_LYSIS	0,99	0,002
IgD.Naive.SF_LYSIS	0,988	0
IgD.Naive.SF_FM	0,982	0
IgD.Unswitched.SF_LYSIS	0,958	0
IgD.Unswitched.SF_FM	0,948	0
IgD.Naive.SF_SF24H	0,898	0
IgD.Unswitched.SF_SF24H	0,889	0
CD27.Unswitched.SF_FM	0,832	0
CD27.Unswitched.SF_LYSIS	0,813	0
CD27.Unswitched.SF_SF24H	0,796	0
IgD.Switched.SF_FM	0,789	0
CD27.Switched.SF_LYSIS	0,78	0
CD27.Naive.SF_LYSIS	0,739	0
CD27.Naive.SF_FM	0,654	0
CD27.Switched.SF_FM	0,645	0
CD19.SF_SF24H	0,589	0
CD27.DN.SF_SF24H	0,535	0
IgD.Switched.SF_LYSIS	0,498	0,001
IgD.Switched.SF_SF24H	0,477	0,006
CD27.Switched.SF_SF24H	0,458	0
IgD.DN.SF_SF24H	0,449	0,024
CD27.Naive.SF_SF24H	0,248	0,003
CD27.DN.SF_FM	0,176	0,261
IgD.DN.SF_LYSIS	0,081	0,375
IgD.DN.SF_FM	0,079	0
CD27.DN.SF_LYSIS	0,005	0,494

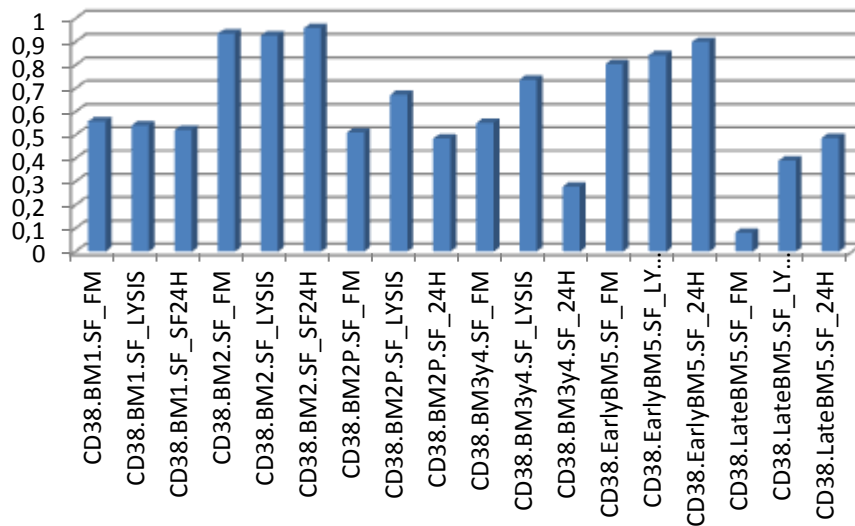
**Tabla 24:** se observan los valores de Alfa de Cronbach, matriz de correlación interelementos y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidades del fluorocromo CD38 en cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación intraclase	Sig.
CD38.BM1.SF_FM	0,556	0,559	0,004
CD38.BM1.SF_LYSIS	0,54	0,541	0,005
CD38.BM1.SF_SF24H	0,532	0,521	0,007
CD38.BM2.SF_FM	0,947	0,935	0
CD38.BM2.SF_LYSIS	0,957	0,927	0
CD38.BM2.SF_SF24H	0,959	0,959	0
CD38.BM2P.SF_FM	0,508	0,511	0,01
CD38.BM2P.SF_LYSIS	0,675	0,673	0
CD38.BM2P.SF_24H	0,532	0,485	0,007
CD38.BM3y4.SF_FM	0,582	0,552	0,002
CD38.BM3y4.SF_LYSIS	0,744	0,737	0
CD38.BM3y4.SF_24H	0,37	0,278	0,067
CD38.EarlyBM5.SF_FM	0,805	0,805	0
CD38.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,852	0,843	0
CD38.EarlyBM5.SF_24H	0,901	0,9	0
CD38.LateBM5.SF_FM	0,09	0,081	0,377
CD38.LateBM5.SF_LYSIS	0,436	0,39	0,029
CD38.LateBM5.SF_24H	0,555	0,488	0,004

**Tabla 25:** se observa, resaltado en negrilla y desplazado hacia la izquierda de la celda, el valor del coeficiente de correlación intraclase más alto para la intensidad del fluorocromo CD38, distribuidos según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) agrupados según el procesamiento de muestra utilizado.

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
<b>CD38.BM1.SF_FM</b>	<b>0,559</b>	0,004
CD38.BM1.SF_LYSIS	0,541	0,005
CD38.BM1.SF_SF24H	0,521	0,007
CD38.BM2.SF_FM	0,935	0
CD38.BM2.SF_LYSIS	0,927	0
<b>CD38.BM2.SF_SF24H</b>	<b>0,959</b>	0
CD38.BM2P.SF_FM	0,511	0,01
<b>CD38.BM2P.SF_LYSIS</b>	<b>0,673</b>	0
CD38.BM2P.SF_24H	0,485	0,007
CD38.BM3y4.SF_FM	0,552	0,002
<b>CD38.BM3y4.SF_LYSIS</b>	<b>0,737</b>	0
CD38.BM3y4.SF_24H	0,278	0,067
CD38.EarlyBM5.SF_FM	0,805	0
CD38.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,843	0
<b>CD38.EarlyBM5.SF_24H</b>	<b>0,9</b>	0
CD38.LateBM5.SF_FM	0,081	0,377
CD38.LateBM5.SF_LYSIS	0,39	0,029
<b>CD38.LateBM5.SF_24H</b>	<b>0,488</b>	0,004

**Gráfico 5:** En el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD38 en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba “gold standard” (Sangre Fresca representada con las siglas SF).



**Tabla 26:** se observa el coeficiente de correlación intraclase, ordenado de mayor a menor, en el estudio de la intensidad de fluorescencia de CD38, en las 6 subpoblaciones linfocitarias que la definen (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5 Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5). De este modo, se ha resaltado con fondo gris, aquellos estudios que han alcanzado un resultado >0,9 lo cual indica una correlación MUY BUENA. Por otro lado, en verde, se han resaltado los estudios que han obtenido una correlación BUENA (coeficiente de correlación intraclase comprendido entre 0,71-0,90).

	Coefficiente de Correlación intraclase	Sig.
CD38.BM1.SF_FM	0,959	0,004
CD38.BM2.SF_SF24H	0,935	0
CD38.BM2.SF_FM	0,927	0
CD38.BM2.SF_LYSIS	0,9	0
CD38.EarlyBM5.SF_24H	0,843	0
CD38.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,805	0
CD38.EarlyBM5.SF_FM	0,737	0
CD38.BM3y4.SF_LYSIS	0,673	0
CD38.BM2P.SF_LYSIS	0,559	0
CD38.BM3y4.SF_FM	0,552	0,002

CD38.BM1.SF_LYSIS	0,541	0,005
CD38.BM1.SF_SF24H	0,521	0,007
CD38.BM2P.SF_FM	0,511	0,01
CD38.LateBM5.SF_24H	0,488	0,004
CD38.BM2P.SF_24H	0,485	0,007
CD38.LateBM5.SF_LYSIS	0,39	0,029
CD38.BM3y4.SF_24H	0,278	0,067
CD38.LateBM5.SF_FM	0,081	0,377

**Tabla 27:** se observan los valores de Alfa de Cronbach, matriz de correlación interelementos y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidad del fluorocromo IgD en cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

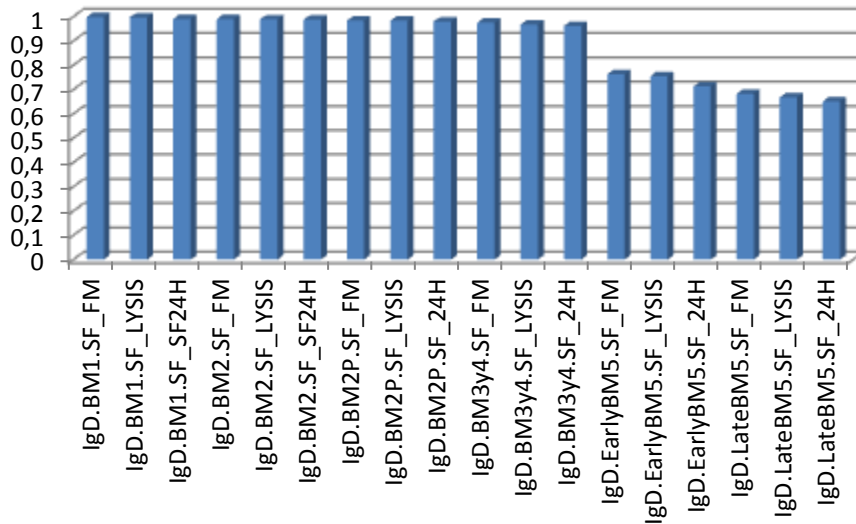
	Alfa de cronbach	Coefficiente de Correlación intraclase	Sig.
IgD.BM1.SF_FM	0,989	0,989	0
IgD.BM1.SF_LYSIS	0,985	0,983	0
IgD.BM1.SF_SF24H	0,971	0,967	0
IgD.BM2.SF_FM	0,997	0,997	0
IgD.BM2.SF_LYSIS	0,998	0,998	0
IgD.BM2.SF_SF24H	0,977	0,962	0
IgD.BM2P.SF_FM	0,988	0,987	0
IgD.BM2P.SF_LYSIS	0,99	0,99	0
IgD.BM2P.SF_24H	0,985	0,975	0
IgD.BM3y4.SF_FM	0,712	0,713	0
IgD.BM3y4.SF_LYSIS	0,783	0,763	0
IgD.BM3y4.SF_24H	0,726	0,683	0
IgD.EarlyBM5.SF_FM	0,982	0,983	0
IgD.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,981	0,98	0
IgD.EarlyBM5.SF_24H	0,991	0,991	0
IgD.LateBM5.SF_FM	0,752	0,755	0
IgD.LateBM5.SF_LYSIS	0,668	0,651	0
IgD.LateBM5.SF_24H	0,69	0,667	0



**Tabla 28:** se observa, resaltado en negrilla y desplazado hacia la izquierda de la celda, el valor del coeficiente de correlación intraclase más alto para la intensidad del fluorocromo IgD, distribuidos según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) agrupados según el procesamiento de muestra utilizado.

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
<b>IgD.BM1.SF_FM</b>	<b>0,989</b>	0
IgD.BM1.SF_LYSIS	0,983	0
IgD.BM1.SF_SF24H	0,967	0
IgD.BM2.SF_FM	0,997	0
<b>IgD.BM2.SF_LYSIS</b>	<b>0,998</b>	0
IgD.BM2.SF_SF24H	0,962	0
IgD.BM2P.SF_FM	0,987	0
<b>IgD.BM2P.SF_LYSIS</b>	<b>0,99</b>	0
IgD.BM2P.SF_24H	0,975	0
IgD.BM3y4.SF_FM	0,713	0
<b>IgD.BM3y4.SF_LYSIS</b>	<b>0,763</b>	0
IgD.BM3y4.SF_24H	0,683	0
IgD.EarlyBM5.SF_FM	0,983	0
IgD.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,98	0
<b>IgD.EarlyBM5.SF_24H</b>	<b>0,991</b>	0
<b>IgD.LateBM5.SF_FM</b>	<b>0,755</b>	0
IgD.LateBM5.SF_LYSIS	0,651	0
IgD.LateBM5.SF_24H	0,667	0

**Gráfico 6:** En el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba “gold standard” (Sangre Fresca representada con las siglas SF).



**Tabla 29:** se observa el coeficiente de correlación intraclase, ordenado de mayor a menor, en el estudio de la intensidad de fluorescencia de IgD, en las 6 subpoblaciones linfocitarias que la definen (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5). De este modo, se ha resaltado con fondo gris, aquellos estudios que han alcanzado un resultado >0,9 lo cual indica una correlación MUY BUENA. Por otro lado, en verde, se han resaltado los estudios que han obtenido una correlación BUENA (coeficiente de correlación intraclase comprendido entre 0,71-0,90).

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
IgD.BM1.SF_FM	0,998	0
IgD.BM1.SF_LYSIS	0,997	0
IgD.BM1.SF_SF24H	0,991	0
IgD.BM2.SF_FM	0,99	0
IgD.BM2.SF_LYSIS	0,989	0
IgD.BM2.SF_SF24H	0,987	0
IgD.BM2P.SF_FM	0,983	0
IgD.BM2P.SF_LYSIS	0,983	0
IgD.BM2P.SF_24H	0,98	0
IgD.BM3y4.SF_FM	0,975	0

IgD.BM3y4.SF_LYSIS	0,967	0
IgD.BM3y4.SF_24H	0,962	0
IgD.EarlyBM5.SF_FM	0,763	0
IgD.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,755	0
IgD.EarlyBM5.SF_24H	0,713	0
IgD.LateBM5.SF_FM	0,683	0
IgD.LateBM5.SF_LYSIS	0,667	0
IgD.LateBM5.SF_24H	0,651	0

**Tabla 30:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos IgD, CD27 y ambos unidos (IgD/CD27), para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B según la Clasificación EuroClass, cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación intraclase	Sig.
IgD.Euroclass.SF_FM	0,994	0,994	0
IgD.Euroclass.SF_Lysis	0,999	0,998	0
IgD.Euroclass.SF_24h	0,98	0,977	0
CD27.Euroclass.SF_FM	0,989	0,989	0
CD27.Euroclass.SF_Lysis	0,992	0,991	0
CD27.Euroclass.SF_24h	0,997	0,967	0
IgD/CD27.Euroclass.SF_FM	0,994	0,994	0
IgD/CD27.Euroclass.SF_Lysis	0,998	0,998	0
IgD/CD27.Euroclass.SF_24h	0,98	0,978	0

**Tabla 31:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos IgD, CD38 y ambos unidos (IgD/CD38), para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B según la Clasificación Bmature, cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
<b>CD38.Bmature.SF_FM</b>	0,883	0,881	0
<b>CD38.Bmature.SF_Lysis</b>	0,923	0,922	0
<b>CD38.Bmature.SF_24h</b>	0,817	0,677	0
<b>IgD.Bmature.SF_FM</b>	0,995	0,995	0
<b>IgD.Bmature.SF_Lysis</b>	0,996	0,996	0
<b>IgD.Bmature.SF_24h</b>	0,986	0,984	0
<b>CD38/IgD.Bmature.SF_FM</b>	0,939	0,939	0
<b>CD38/IgD.Bmature.SF_Lysis</b>	0,958	0,958	0
<b>CD38/IgD.Bmature.SF_24h</b>	0,908	0,902	0

## 5. DISCUSIÓN.

---

### 5.1. IDEAS PRELIMINARES EN LA DISCUSIÓN.

La medición es un proceso inherente tanto a la práctica como a la investigación clínica. Mientras que algunas variables son relativamente sencillas de medir (como el peso o la tensión arterial) otras comportan cierto grado de subjetividad que hace especialmente difícil su medición, como la intensidad del dolor o el concepto de calidad de vida. En cualquier caso, el proceso de medición conlleva siempre algún grado de error. Existen factores asociados a los individuos, al observador o al instrumento de medida que pueden influir en la variación de las mediciones.<sup>4,5</sup> En la medida de la temperatura corporal, por ejemplo, pueden aparecer errores en el registro debidos tanto al estado del paciente, como a defectos en el termómetro utilizado o a la objetividad del observador. *La medición es un proceso inherente tanto a la práctica como a la investigación clínica.* En el caso de la citometría de flujo, son muchos los factores que pueden intervenir en el desarrollo de algún tipo de error, debido fundamentalmente a que se trata de una técnica compleja sujeta a numerosos pasos, todos ellos con varias o múltiples posibilidades. Es una técnica con fuertes aplicaciones en los laboratorios de investigación, pero con algunas dificultades actuales para su aplicación en la práctica clínica habitual.

Los procesamientos de muestra utilizados (en sangre periférica) pueden variar según la experiencia y los protocolos de los distintos grupos, debido fundamentalmente a los tiempos y sustancias/fluorocromos empleadas. Así pues, en este estudio se ha contemplado 4 procesamientos de muestras que no han sido elegidos al azar, sino que han sido los recomendados por el grupo de investigación del Dr. Ignacio Sanz de *la Unidad de Reumatología, Inmunología y Alergia del Strong Memorial Hospital (Rochester, N.Y)*, actualmente perteneciente al grupo de Inmunología de la Universidad de Emory. De entre estos 4 procedimientos, el primero de ellos (denominado como SF) ha sido considerado como el método Gold Standard, dado que está sujeto a escasas modificaciones. En este caso las posibilidades de alterar las propiedades citométricas de la muestra sanguínea son mínimas; la sangre es

inmediatamente procesada para su valoración en el citómetro de flujo, tras escasos minutos después de su extracción. Los otros tres procedimientos que han sido estudiados (SF24h, FM y Lysis) no son más que variaciones realizadas sobre el método anterior, ajustadas a las posibles complicaciones que de la práctica clínica habitual pueden originarse. Estos 3 procesamientos intentan, por tanto, demorar temporalmente el estudio de estas muestras, para de este modo estar más adaptadas a la práctica clínica habitual.<sup>82</sup>

No en pocos casos, los resultados obtenidos por citometría no han sido validados, debido a que los protocolos utilizados han provocado, de algún modo, variaciones en los resultados finales. En general, La partículas o células deben ser analizadas inmediatamente después del marcaje inmunofenotípico o deben ser fijadas. La fijación se realiza durante un tiempo mínimo de 1 h en presencia de paraformaldehído. *No obstante, es importante tener en cuenta que la distribución de los parámetros de dispersión frontal (FS) y ortogonal (SC) de la luz cambia durante el proceso de fijación, ya que el proceso de entrecruzamiento de proteínas provoca cambios en la forma y granularidad de las células.* Otra cosa, es considerar que la superficie celular se vea modificada. En este estudio, los fluorocromos utilizados son de superficie celular, por lo cual no existen datos que hagan pensar que la fijación provoque cambios en este sentido.<sup>82</sup> Incluso, técnicas como la congelación han sido validadas para conseguir muestras sanguíneas estables, que puedan ser estudiadas incluso días más tardes.<sup>82</sup> No obstante, este procedimiento es muy discutido en la actualidad, dado que existen estudios que aseguran alteraciones en la superficie de la membrana celular, y por ende, alteraciones en los marcadores de superficie.<sup>83</sup>

En la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se ha utilizado un paraformaldehído del 1%<sup>2,84</sup>, mientras que en este estudio el porcentaje de paraformaldehído ha sido del 5%. *Sue Chow et al.*<sup>85</sup> desarrolló un estudio muy interesante, en el que comparó la influencia de dos concentraciones de paraformaldehído (2% vs 4%) en la expresión de marcadores de superficie leucocitaria. Se observó que los datos de expresión de estos marcadores y la intensidad de autofluorescencia de los fluorocromos, era mayor con el uso de paraformaldehído al

4%. La posibilidad de realizar estudios para establecer qué diferencias ocasionan las diferentes concentraciones de este fijador, puede motivar la ejecución de otros estudios en un futuro, entendiendo que la horquilla porcentual en estas concentraciones oscila en la mayoría de los estudio entre el 1-5%.

En general, se recomienda que las muestras destinadas a su estudio citométrico deberían de ser transportadas y procesadas de forma inmediata después de la flebotomía.<sup>86 87</sup> Una de las más cuestiones más extendidas es cuánto tiempo puede permanecer una muestra hasta ser procesada en el citómetro. En este sentido la literatura es limitada con escasa publicaciones y escasa referencias en las guías. Entre 24-36h (a temperatura ambiente) no parece existir cambios significativos en la antigenicidad. Estudios comprendidos entre las 48-72h, sólo son estables si se añaden medios celulares tales como RPMI-1640 o la solución de McCoy's y almacenadas a 4°C.<sup>87</sup> Más allá de 72h, la antigenicidad de la muestra se vería muy mermada y no resulta muy recomendable.

La temperatura también parece tener gran importancia de cara a la conservación de las muestras. Se recomienda que la temperatura de la habitación esté comprendida entre los 16°-28°C. Concretamente los 16°C es la temperatura más adecuada para el mantenimiento de estas muestras.<sup>88</sup> No existen datos concluyentes sobre la dicotomía entre el almacenaje de la muestra a temperatura ambiente vs en frigorífico a 2°-8°C.<sup>88-90</sup> En ningún caso las temperaturas >37°C y la refrigeración por debajo de los 2°C han sido aceptadas para el almacenamiento de las muestras.<sup>87</sup>

Son tantas las variables que se suman al proceso de preparación de estas muestras, que incluso el uso de EDTA (anticoagulante) ha sido motivo de estudio en otras publicaciones.<sup>89,90</sup> En general su uso está fuertemente extendido y recomendado.<sup>87</sup> Sólo algunas excepciones se deben tener en cuenta. Si la muestra va a demorarse más de 24h su estudio en el citómetro, parece que el EDTA se relaciona con algunas alteraciones en la expresión de determinados antígenos (Ej: CD11b en la superficie de los neutrófilos)<sup>88,90</sup> y fomenta la agregación plaquetaria, con lo cual no se aconseja su uso para el estudio de megacariocitos.<sup>89</sup> Por el contrario, no existen datos que informen que el tubo de EDTA origine alguna alteración citológica de cara al

estudio de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica, de ahí el uso en los distintos procesamientos de muestras de este estudio.

Así pues, bien es conocido que, si los inicios de la citometría de flujo estuvieron en clara asociación con la investigación biomédica,<sup>91</sup> en la actualidad es una técnica cada vez más empleada en la práctica clínica habitual, sobre todo, en los campos de la hematología y enfermedades infecciosas.<sup>92,93</sup> Esto ha provocado, que frente a la rigidez de actuación al que están sometidos los ensayos clínicos y el resto de situaciones relacionadas con la investigación biomédica, la inclusión de la citometría de flujo en la práctica clínica habitual ha originado que estos protocolos estén sujetos a la variabilidad situacional del día a día en el ejercicio esta práctica. Con todo esto, han sido muchos los grupos de investigación que se han dedicado a protocolizar de una forma más real los procesamientos de estas muestras y el estudio de subpoblaciones linfocitarias en el citómetro.<sup>94,95</sup>

Cualquier estudio clínico debe garantizar la calidad de sus mediciones, no sólo porque condicionará en gran medida la validez de sus conclusiones, sino por la importancia de las decisiones clínicas que se apoyen en esa investigación.<sup>96</sup> La calidad de una medida depende tanto de su validez como de su fiabilidad.<sup>4,97</sup> Mientras que la validez expresa el grado en el que realmente se mide el fenómeno de interés, la fiabilidad indica hasta qué punto se obtienen los mismos valores al efectuar la medición en más de una ocasión, bajo condiciones similares. El que una medida sea muy precisa no implica, sin embargo, que sea necesariamente válida. Así, si se realizan dos medidas consecutivas de la presión arterial de un paciente con un esfigmomanómetro mal calibrado los valores obtenidos seguramente serán parecidos, aunque totalmente inexactos.

En los estudios que tratan de evaluar la validez de una medida se comparan sus resultados con los obtenidos mediante una prueba de referencia (*gold standard*) que se sabe válida y fiable para la medición del fenómeno de interés.<sup>33</sup> En nuestro estudio, el procedimiento número 1 expresado como SF ha sido elegido como “gold standard”. Es este procesamiento el que ocasiona menos alteraciones en la superficie celular y, por ende, el que aporta mejores resultados para el estudio citométrico. No se debe



olvidar, que los fluorocromos que se han utilizados son moléculas cuyo receptor se halla en la superficie de la membrana celular, con lo cual la viabilidad e integridad de la misma es necesaria para que la interacción receptor/fluorocromo sea el más adecuado.<sup>98,99</sup> Cualquier situación ambiental, cronológica o material que altere esta estructura provocaría alteraciones en la determinación citométrica. Por otra parte, para la definición de otras subpoblaciones son necesarios otros fluorocromos cuyo objetivo molecular no está en la superficie celular y sí en el interior de la misma (citoplasma, superficie nuclear, núcleo,...) siendo necesarios otros procesamientos distintos a los aquí reflejados.<sup>98,99</sup>

Cuando el objetivo se centra en la fiabilidad de una medición, se repite el proceso de medida para evaluar la concordancia entre las distintas mediciones. En un estudio de la fiabilidad pueden valorarse los siguientes aspectos:

1. Repetibilidad: indica hasta qué punto un instrumento proporciona resultados similares cuando se aplica a una misma persona en más de una ocasión, pero en idénticas condiciones.

2. Concordancia intraobservador: tiene por objetivo evaluar el grado de consistencia al efectuar la medición de un observador consigo mismo.

3. Concordancia interobservador: se refiere a la consistencia entre dos observadores distintos cuando evalúan una misma medida en un mismo individuo.

4. Concordancia entre métodos de medición: cuando existen diferentes métodos de medida para un mismo fenómeno, es interesante estudiar hasta qué punto los resultados obtenidos con ambos instrumentos son equivalentes.

La concordancia entre métodos es de sumo interés en la práctica clínica habitual.<sup>9,16,100,101</sup> La concordancia entre mediciones puede alterarse no sólo por la variabilidad de los observadores, sino por la variabilidad del instrumento de medida, por el propio proceso a medir si se realiza en momentos y/o métodos diferentes. Por todo ello, son necesarios estudios como este que intenten estudiar el grado de

concordancia entre distintos métodos destinados a la evaluación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B por citometría de flujo.

## 5.2. EN CUANTO A LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

No han sido pocos los estudios multicéntricos, en los que a pesar de estandarizar la técnica y los protocolos entre los distintos centros, los resultados reportados han sido muy diferentes. La temperatura, la luminosidad, el tiempo de almacenamiento,... han estado detrás de estas modificaciones.

La citometría de flujo, es una técnica con una consagrada implantación en el mundo de la investigación biomédica y cada vez más, su uso se está extendiendo en la práctica clínica habitual.<sup>100</sup> Este paso del laboratorio a la práctica clínica muchas veces no es fácil, probablemente porque su implantación supone adaptar estas técnicas a la vida real; y en no pocas ocasiones se producen enormes diferencias entre ambas situaciones. La vida en el laboratorio se puede controlar relativamente; así por ejemplo se puede determinar el momento en el que se produce una toma de muestra y cuánto tiempo se empleará en realizar un determinado análisis y/o estudio. Otras situaciones como las ambientales (temperatura, humedad, luminosidad,...) son también controladas. Esto no ocurre en la vida diaria, en la que los pacientes acuden a sus centros sanitarios sin un horario establecido y en circunstancias para nada controlables. Por todo ello, adaptar los protocolos o procedimientos de muestra de la citometría de flujo, para su uso en la práctica clínica es fundamental de cara a su mayor implantación como medida diagnóstica/pronóstica.

Independientemente de otras consideraciones, la situación más favorable de cara al procesamiento de muestra en el campo de la citometría de flujo, viene de la mano del tiempo que transcurre desde la extracción sanguínea hasta su estudio en el citómetro. Existen muchas opiniones en torno al máximo tiempo empleado desde que la sangre es extraída hasta su estudio en el citómetro.<sup>82,102</sup> Este espacio no debe de ser mayor de 24 horas, ya que tras este espacio se ha demostrado que la estructura celular (superficie, citoplasma y núcleo) deja de mantener su estructura fisiológica y bioquímica inicial.<sup>103</sup> Este hecho, correspondería al procesamiento de muestra (sangre

periférica) que hemos considerado como “gold standard”, es decir, el procesamiento de la muestra en el que la sangre extraída es inmediatamente estudiada en el citómetro de flujo, siguiendo el protocolo habitual. El desarrollo de otros procedimientos más ajustados a la realidad clínica, que tengan en cuenta la demora temporal que puede originarse en la extracción de la muestra y su estudio en el citómetro, ha sido el motivo fundamental de este proyecto.

En los resultados obtenidos en este estudio podemos realizar varias consideraciones; tantas como secciones pretendamos considerar. No obstante, es adecuado racionalizar estos resultados, para de este modo concretar las conclusiones que de este estudio se pueden obtener.

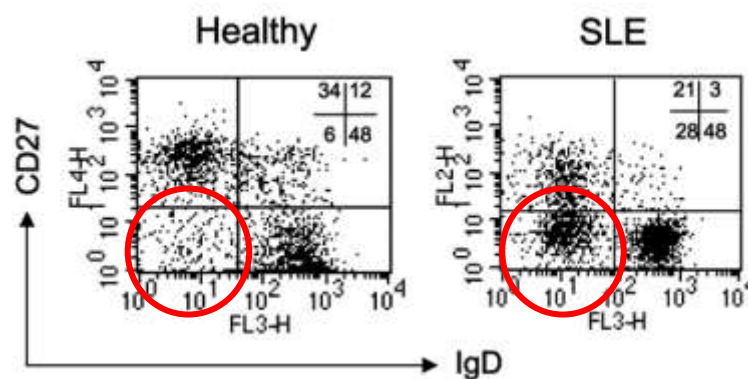
Con las tablas que se han obtenido en los resultados, se cuenta con unos niveles de referencia de gran importancia de cara a realizar estudios futuros que cuenten con una población control de normalidad. Como puede observarse, se ofrecen las medias y medianas de cada una de las subpoblaciones estudiadas según el protocolo empleado. De este modo, si se pretende conocer qué subpoblaciones están más implicadas en las enfermedades autoinmunes, se debe de comparar los patrones citométricos obtenidos, con los estudios presentes en la población normal.<sup>106</sup>

En la tabla que a continuación se presenta, se obtiene un punto de partida cuantitativo de las diferentes subpoblaciones linfocitarias tipo B, con los que comparar en caso de estudios centrados enfermedades autoinmunes.

**Tabla 4:** se expresan la media, desviación típica, valores máximo y mínimo, mediana y los percentiles 25 y 75% de cada una de las subpoblaciones linfocitarias tipo B estudiadas (CD19, Naive, DN, Unswitched Memory, Switched Memory, Bm1, Bm2, Bm3 y 4, PreGC, late Bm5 y early Bm5) según el procedimiento Gold Standard (SF).

Supoblación Linf_ Procedimiento empleado	N		Percentiles(*)						
	Válidos	Perdidos	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	25	Mediana	75
CD19_SF	50	0	<b>11,7512</b>	<b>4,74546</b>	1,54	18,70	6,7375	13,1500	16,2500
Naive_SF	50	0	70,4680	8,06174	52,90	84,10	<b>62,7250</b>	<b>73,7000</b>	<b>76,2250</b>
DN_SF	50	0	<b>4,0524</b>	<b>2,08289</b>	,72	9,73	1,9325	4,6550	5,4725
UnswitchedMemory_SF	50	0	9,6474	5,32935	2,40	21,30	<b>5,0200</b>	<b>10,0500</b>	<b>13,3750</b>
SwitchedMemoryPB_SF	50	0	11,3804	4,61939	4,40	23,30	<b>7,5450</b>	<b>11,0000</b>	<b>15,2750</b>
Bm1_SF	50	0	6,9810	6,66850	,52	29,70	<b>3,3075</b>	<b>5,1000</b>	<b>9,0150</b>
Bm2_SF	50	0	<b>73,9640</b>	<b>8,14403</b>	57,60	87,30	67,7000	73,0500	82,3250
Bm3y4_SF	50	0	,5654	,52387	,00	2,77	<b>,2328</b>	<b>,4380</b>	<b>,7683</b>
PreGC_SF	50	0	<b>2,9274</b>	<b>1,57481</b>	1,09	6,08	1,4100	2,8900	3,9275
LateBm5_SF	50	0	<b>2,9516</b>	<b>1,84443</b>	,83	7,90	1,4550	2,5000	3,9100
EarlyBm5_SF	50	0	<b>9,3420</b>	<b>4,84178</b>	1,98	24,00	5,2300	10,1100	12,4500

Saber en qué medida estos valores se modifican es de gran importancia para el estudio patogénico de este grupo de enfermedades. Así pues, se ha constatado que en pacientes con LES activo la población DN está claramente expandida respecto a la población local (ver a continuación diagrama explicativo de este hecho, cedido por el Dr. I. Sanz). De igual modo, otras enfermedades autoinmunes y terapias biológicas, están siendo valoradas con citometría de flujo, intentando detectar posibles vías patogénicas.



Si se atiende al coeficiente de correlación intraclase (CCI), se observa que la mayoría de las subpoblaciones alcanzan un coeficiente mayor de 0,7, lo cual indica una correlación buena (0,7-0,9) o muy buena (>0,9). Sólo Naive.SF\_SF24h, SwitchedMemory.SF-SF24h, Bm3y4.SF\_LYSIS, Bm3y4.SF\_SF24h, LateBM5.SF\_FM, LateBm5.SF\_Lysis y LateBm5.SF\_SF24h, obtienen una correlación subóptima (<0.7).

Por otra parte, se observa que la subpoblación Bm3y4 y la subpoblación LateBm5, en ninguno de los tres procesamientos de muestras alcanzaron un CCI mayor de 0,7. Es importante, dejar claro –en virtud de esta afirmación– que estas dos subpoblaciones se verían claramente afectadas, en caso de que el estudio se realizara según alguno de los tres procedimientos en estudio y no por el “gold standard”.

Destacan los valores de LateBm5 cuando los procedimientos utilizados son FM o Lysis, ya que sus resultados son en torno a 0,4, no alcanzando más allá del 0,6 cuando se usa el procedimiento SF24h, lo cual indica una correlación muy pobre. Esta situación no se debe olvidar de cara a conclusiones de cara a esta subpoblación, no pudiéndose demorar su estudio según los procesamientos de sangre utilizados.

La tabla que a continuación se expone es de gran utilidad de cara a poder realizar conclusiones un poco más generales y no tan centradas en las distintas subpoblaciones linfocitarias (*tabla 20*).

**Tabla 20:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de las subpoblaciones linfocitarias tipo B según la Clasificación EuroClass, la Clasificación Bmature y sumando los resultados de ambas clasificaciones (EuroClass + Bmature), cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como “gold standard” (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación Intraclase	Sig.
<b>Clasif. Euroclass.SF_FM</b>	0,997	0,997	0
<b>Clasif. Euroclass.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>Clasif. Euroclass.SF_SF24h</b>	0,99	0,99	0
<b>Clasif. Bmature.SF_FM</b>	0,997	0,997	0
<b>Clasif. Bmature.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>Clasif. Bmature.SF_SF24h</b>	0,996	0,996	0
<b>Clasif. Euroclass+Bmature.SF_FM</b>	0,997	0,997	0
<b>Clasif. Euroclass+Bmature.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>Clasif. Euroclass+Bmature.SF_SF24h</b>	0,993	0,993	0

Si dividimos el estudio en los dos grupos de subpoblaciones linfocitarias estudiadas: (1) **Clasificación Euroclass** y (2) **Clasificación B mature**, se observan que en todos los casos el Alfa de Cronbach y el Coeficiente de Correlación Intraclase superan los 0,9. Estos resultados ofrecen, por tanto, una importante conclusión: *LOS TRES PROCESAMIENTOS DE MUESTRA EN ESTUDIO APORTAN DATOS CON UNA FIABILIDAD MUY ALTA Y, POR TANTO, EXTRAPOLABLES A LOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA GOLD STANDARD*. Se puede considerar esta frase como la más relevante de todo el estudio. En este proyecto se aportan datos parciales muy interesantes, de cara a conocer el comportamiento que presenta una subpoblación linfocitaria en uno u otro método, pero es necesario conocer qué procedimientos podemos usar de cara al estudio de estas subpoblaciones. Con todo ello, se puede llegar a concluir que los tres métodos que han sido estudiados son igualmente fiables.

No parece, por tanto, que:

- Demorar la muestra de sangre en el tubo de EDTA durante 24h y después iniciar todo el proceso (como ocurre en el procedimiento denominado SF24h).

- Demorar el procesamiento de la muestra durante 24h, una vez aplicada la sustancia lisante, para reanudarlo una vez concluido este periodo (como ocurre en el procedimiento denominado como Lysis).

- O demorar 24h el procesamiento de la muestra en el citómetro una vez completado todo el proceso, tras la administración de formaldehído.

Tengan influencia sobre los resultados finales obtenidos en el citómetro.

Esto es muy importante, dado que permite tener cierto margen de maniobra temporal, a la hora del uso del citómetro en el estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B. Así por ejemplo, si la muestra se ha obtenido durante un fin de semana y no se dispone de un equipo de laboratorio para prepararla, se puede mantener la muestra en una zona oscura y a temperatura ambiente durante 24h, sin riesgo de ocasionar alteraciones para el estudio en el citómetro.

Supongamos, que se ha completado el procedimiento con la muestra de sangre, pero el citómetro no está disponible o se ha averiado. Se haría uso del procedimiento conocido como FM. A la muestra se le añadirían 100µl de formaldehído y se mantendría 24h, sin riesgo para la integridad de la muestra.

Otra alternativa, nos la aporta el procedimiento denominado como Lysis. Una circunstancia puntual, puede ser que la centrifugadora no esté disponible (avería, uso permanente,...); en este caso, una vez completado el paso de lisado (con sustancia lisante BD FACs concentrada al 10x), se puede pasar a su almacenamiento a unos 4°C y después de 24h reiniciar el procesamiento, sin riesgo para la antigenicidad linfocitaria.

Los costes de los fluorocromos y demás fungibles utilizados en la citometría de flujo son altos.<sup>107</sup> A esto se suma que en la mayoría de ocasiones, son varias las muestras sanguíneas (pueden llegar a varios cientos) que se procesan paralelamente. Y no todo queda aquí... El momento de extracción, a veces, no es reproducible/repetible, de tal modo, que las circunstancias del paciente han podido cambiar respecto a su extracción inicial; el inicio de una terapia biológica inmunodepresora tras la extracción inicial, alteraría irremediabilmente los resultados obtenidos de cara a una segunda muestra. Con todo esto, es necesario estudios como este, que intenten ofrecer alternativas ante la presencia situaciones adversas (ya sean técnicas y/o humanas), para de este modo no ocasionar pérdidas muestrales, que en no pocas ocasiones han supuesto un gran gasto económico y/o pertenecen a pacientes muy seleccionados, donde las posibilidades de obtener nuevas muestras no sería posible.

Se abren nuevas vías de estudio en este sentido, tantas como situaciones cotidianas puedan ocurrir en el segmento que va desde la extracción sanguínea hasta la obtención de resultados en el ordenador del citómetro. Valga esto, para estimular nuevas vías de análisis, que favorezcan y potencien la inclusión de la citometría de flujo en la práctica clínica habitual.

### 5. 3. EN CUANTO A LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LOS FLUOROCROMOS.

En un segundo plano, se decidió estudiar la intensidad de fluorescencia de los distintos fluorocromos utilizados en este estudio y cómo varían según el protocolo empleado.

El propósito del análisis del inmunofenotipado en la serie linfocítica es la identificación y enumeración de estas subpoblaciones linfocitarias. La determinación de la intensidad de fluorescencia puede añadir información biológica relevante, dado que esta intensidad está directamente relacionada con los niveles de expresión antigénica. A su vez, por tanto, esta información puede tener implicaciones directas sobre el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de determinadas condiciones patológicas.<sup>105</sup>

Los resultados obtenidos no deben ser extendidos a todos los fluorocromos empleados en el campo de la citometría de flujo, ni tan siquiera a los fluorocromos utilizados en este estudio, entendidos desde su concepto más genérico. Los resultados han de ser, por tanto, aplicables sólo y exclusivamente a los productos comerciales que se han empleado en este estudio, ya que existe constancia de la variabilidad en la intensidad de fluorescencia, dependiendo de la marca comercial utilizada. Es importante pues, dejar constancia que los fluorocromos utilizados han sido: PE MOUSE ANTI-HUMAN Ig D, APC-Cy™7 Mouse Anti-Human CD19, PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD38, Anti-Human CD 27 APC Y Pacific Blue™ Mouse Anti-Human CD3.

#### 5.3.1. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE IgD Y CD27. CLASIFICACIÓN EUROCLASS.

Si tomamos la siguiente tabla (*tabla 22*), en la que se evalúan los dos fluorocromos necesarios para la obtención de la **clasificación de Euroclass: Ig D y CD27**, podemos sacar algunas conclusiones.



Tabla 22: se observa resultado en negrilla y desplazado hacia la izquierda de la celda, el valor del coeficiente de correlación intraclase más alto para cada uno de los fluorocromos estudiados (CD 19, IgD y CD27) distribuidos según las subpoblaciones linfocitarias (DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory) agrupados según el procesamiento de muestra utilizado.

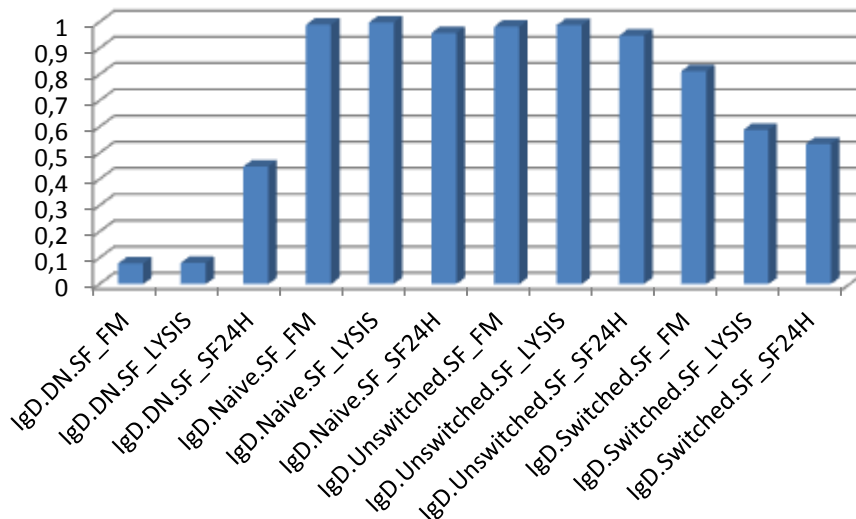
	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
IgD.DN.SF_FM	0,079	0,00
IgD.DN.SF_LYSIS	0,081	0,375
IgD.DN.SF_SF24H	<b>0,449</b>	0,024
IgD.Naive.SF_FM	0,99	0,00
IgD.Naive.SF_LYSIS	<b>0,998</b>	0,00
IgD.Naive.SF_SF24H	0,958	0,00
IgD.Unswitched.SF_FM	0,982	0,00
IgD.Unswitched.SF_LYSIS	<b>0,988</b>	0,00
IgD.Unswitched.SF_SF24H	0,948	0,00
IgD.Switched.SF_FM	<b>0,813</b>	0,00
IgD.Switched.SF_LYSIS	0,589	0,001
IgD.Switched.SF_SF24H	0,535	0,006
CD27.DN.SF_FM	0,176	0,261
CD27.DN.SF_LYSIS	0,005	0,494
CD27.DN.SF_SF24H	<b>0,645</b>	0,00
CD27.Naive.SF_FM	0,78	0,00
CD27.Naive.SF_LYSIS	<b>0,789</b>	0,00
CD27.Naive.SF_SF24H	0,248	0,003
CD27.Unswitched.SF_FM	<b>0,898</b>	0,00
CD27.Unswitched.SF_LYSIS	0,889	0,00
CD27.Unswitched.SF_SF24H	0,832	0,00
CD27.Switched.SF_FM	0,739	0,00
CD27.Switched.SF_LYSIS	<b>0,796</b>	0,00
CD27.Switched.SF_SF24H	0,458	0,00

En ella se puede observar que apenas 6 determinaciones presentan un CCI superior a 0,9. Estas son: IgD Naive SF\_FM, IgD Naive SF\_Lysis, Ig D Naive SF\_SF24h, Ig D Unswitched SF\_FM, IgD Unswitched SF\_Lysis e IgD Unswitched SF\_SF24h. En ningún caso se observa que CD27 alcance una correlación muy buena (> 0,9). No obstante, en la mayoría de los casos, tanto para CD27 como para IgD, los CCI están comprendidos entre 0,7-0,9, indicando una correlación buena.

Por otra parte, se observa que CD27 en la subpoblación DN (valor máximo de CCI es 0,645) e IgD en DN (valor máximo de CCI es 0,449), presentan en todos los procedimientos utilizados una correlación moderada o pobre. Es importante tener en cuenta que esta subpoblación (*Double Negative* –DN-) se obtiene gracias a la falta de fijación de IgD y CD27 en su superficie, de ahí su nombre (doblemente negativa para

los dos fluorocromos utilizados). Con lo cual, esta falta de correlación está determinada por este hecho y no tanto por la fluorescencia de los fluorocromos.

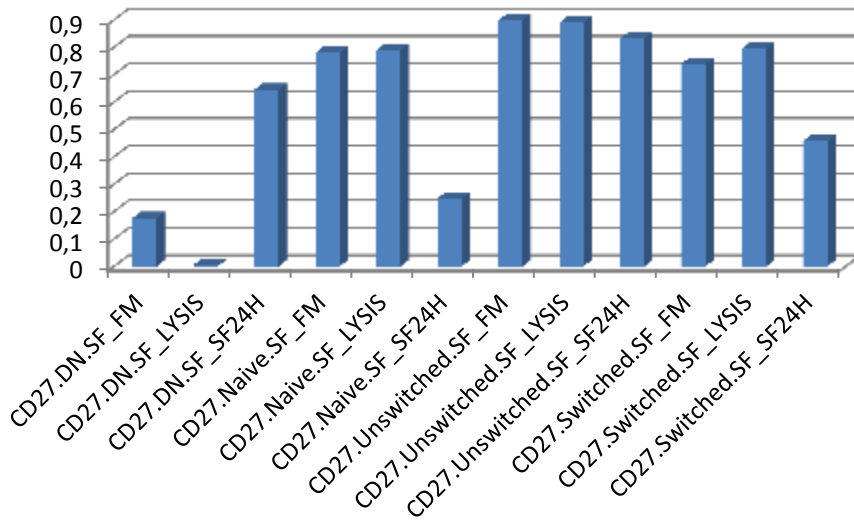
En la *gráfica 3* aplicado **sólo para IgD**, este dato puede observarse de un modo más gráfico. Son las subpoblaciones de ambos extremos (DN y Switched Memory) las que peor correlación obtienen, coincidiendo con las subpoblaciones definidas por la falta de fluorescencia en el citómetro: DN (IgD- CD27-) y Switched Memory (IgD- CD27+). En cambio las centrales, aquellas que están definidas por una positividad de fluorescencia en su análisis citométrico (Unswitched Memory IgD+ CD27+ y Naive IgD+ CD27-), tienen una correlación buena y muy buena. Con lo cual, se puede determinar que el fluorocromo IgD tiene una óptima correlación en la intensidad de fluorescencia según los distintos proceso en estudio.



**Gráfico 3:** en el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Naive, DN, Unswitched memory y Switched memory) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba "gold standard" (Sangre Fresca representada con las siglas SF).

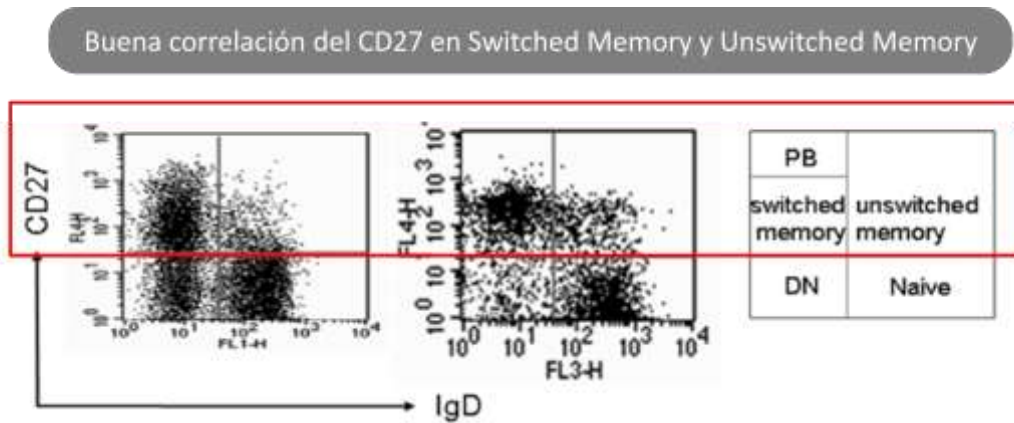
En la *gráfica 4* aplicado **sólo para CD27**, ocurre de forma similar lo observado en IgD. Son las subpoblaciones definidas por una positividad de fluorescencia en su análisis citométrico (Unswitched Memory IgD+ CD27+ y Switched Memory IgD- CD27+), las que tienen una correlación buena y muy buena. Con lo cual, se puede determinar que el fluorocromo CD27 tiene una óptima correlación en la intensidad de fluorescencia según los distintos proceso en estudio (0,7-0,9).

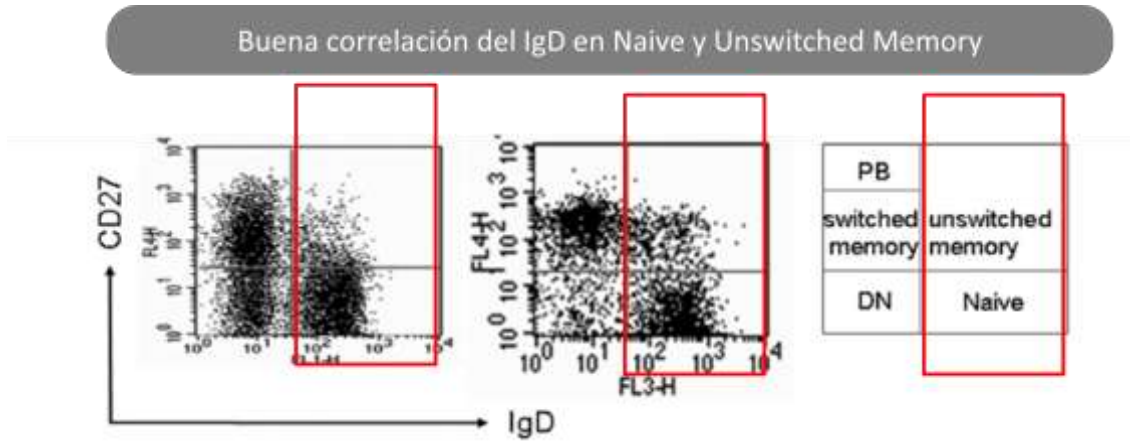
Sólo cabría destacar que CD27 disminuye su intensidad de fluorescencia de forma importante (CCI de 0,458) en la subpoblación Switched Memory cuando el procesamiento de la sangre se demora unas 24h (Procedimiento denominado SF24h).



**Gráfico 4:** en el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD27 en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Naive, DN, Unswitched memory y Switched memory) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba "gold standard" (Sangre Fresca representada con las siglas SF).

Sirva esta figura para ilustrar lo comentado líneas atrás.





### 5.3.2. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE Ig D Y CD38. CLASIFICACIÓN B mature.

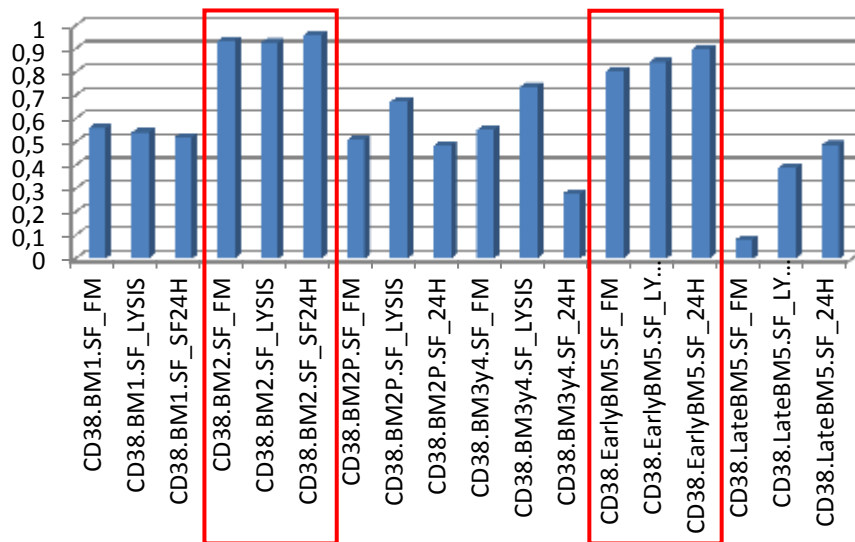
Centrados ahora en la clasificación B mature, concretamente en el fluorocromo **CD38** (tabla 25) se observa como sólo las subpoblaciones Bm2 y Early Bm5 superan un CCI >0,9 (correlación muy buena). Son late Bm5 y Bm1 las que peores CCI obtienen (en ambos casos menor de 0,7), lo que corresponde con una correlación muy pobre.

**Tabla 25:** se observa, resaltado en negrilla y desplazado hacia la izquierda de la celda, el valor del coeficiente de correlación intraclase más alto para la intensidad del fluorocromo CD38, distribuidos según las subpoblaciones linfocitarias (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) agrupados según el procesamiento de muestra utilizado.

	Coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
<b>CD38.BM1.SF_FM</b>	<b>0,559</b>	0,004
CD38.BM1.SF_LYSIS	0,541	0,005
CD38.BM1.SF_SF24H	0,521	0,007
CD38.BM2.SF_FM	0,935	0
CD38.BM2.SF_LYSIS	0,927	0
<b>CD38.BM2.SF_SF24H</b>	<b>0,959</b>	0
CD38.BM2P.SF_FM	0,511	0,01
<b>CD38.BM2P.SF_LYSIS</b>	<b>0,673</b>	0
CD38.BM2P.SF_24H	0,485	0,007
CD38.BM3y4.SF_FM	0,552	0,002
<b>CD38.BM3y4.SF_LYSIS</b>	<b>0,737</b>	0
CD38.BM3y4.SF_24H	0,278	0,067
CD38.EarlyBM5.SF_FM	0,805	0
CD38.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,843	0
<b>CD38.EarlyBM5.SF_24H</b>	<b>0,9</b>	0
CD38.LateBM5.SF_FM	0,081	0,377
CD38.LateBM5.SF_LYSIS	0,39	0,029
<b>CD38.LateBM5.SF_24H</b>	<b>0,488</b>	0,004

Esto puede contemplarse de forma más gráfica en la siguiente ilustración (*gráfico 5*). Mantenemos por tanto el mismo discurso que para IgD y CD27 en la clasificación EUROClass. La positividad de fluorescencia del CD38 propia de estas dos subpoblaciones: Early Bm5 IgD-CD38+ (mayor de 0,8 de CCI en todos los procedimientos) y Bm2 IgD+ CD38+ (mayor de 0,9 de CCI en todos los procedimientos), se correlaciona con el alto grado de correlación en los resultados de la intensidad de fluorescencia (*ver gráfico 5; cuadros en rojo*).

No obstante, existe una discrepancia respecto a lo que hemos comentado. Las subpoblaciones Bm3/Bm4 (IgD- CD38++) y Bm2' (IgD+ CD38++) son definidas por una mayor positividad para el CD38. Sin embargo, su CCI en ambos casos está en torno a 0,6-0,7 (correlación moderada). Esto se debe a que estas subpoblaciones son muy escasas en la población humana sana, de ahí que las posibilidades de establecer fuertes procesos de correlación no sea posible; por ello algunos de estos datos no son estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ). La subpoblación Bm2' tiene una media de representación de un 2,98%. Por su parte, los centroblastos Bm3 y centrocitos Bm4 son aún más escasos y no suelen superar la representación del 0,2-0,3% del total de subpoblaciones.<sup>15</sup>

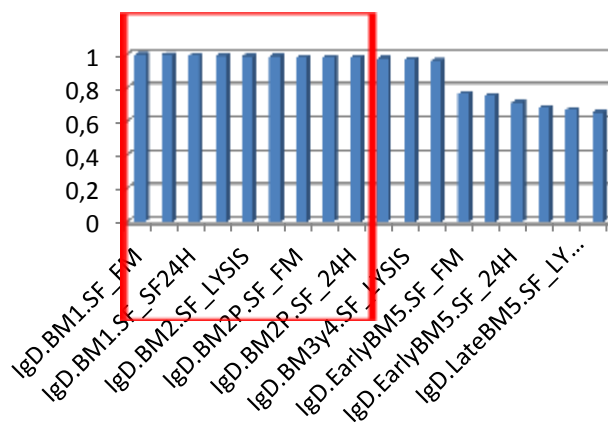


**Gráfico 5:** En el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo CD38 en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba "gold standard" (Sangre Fresca representada con las siglas SF).

En relación a IgD, no hay cambios en cuanto al discurso que se sigue hasta ahora. Su intensidad de fluorescencia tiene una buena correlación en todos los procesamientos de muestra utilizados, dado que los CCI superan el 0,9, para con las subpoblaciones linfocitarias IgD+: Bm1, Bm2 y Bm2'. Por el contrario, las subpoblaciones definidas por IgD- (Early Bm5 y Late Bm5) sus CCI son más discretos, debido a que la intensidad de fluorescencia no está presente, por ser subpoblaciones muy pobres en marcadores de superficie para este fluorocromo.

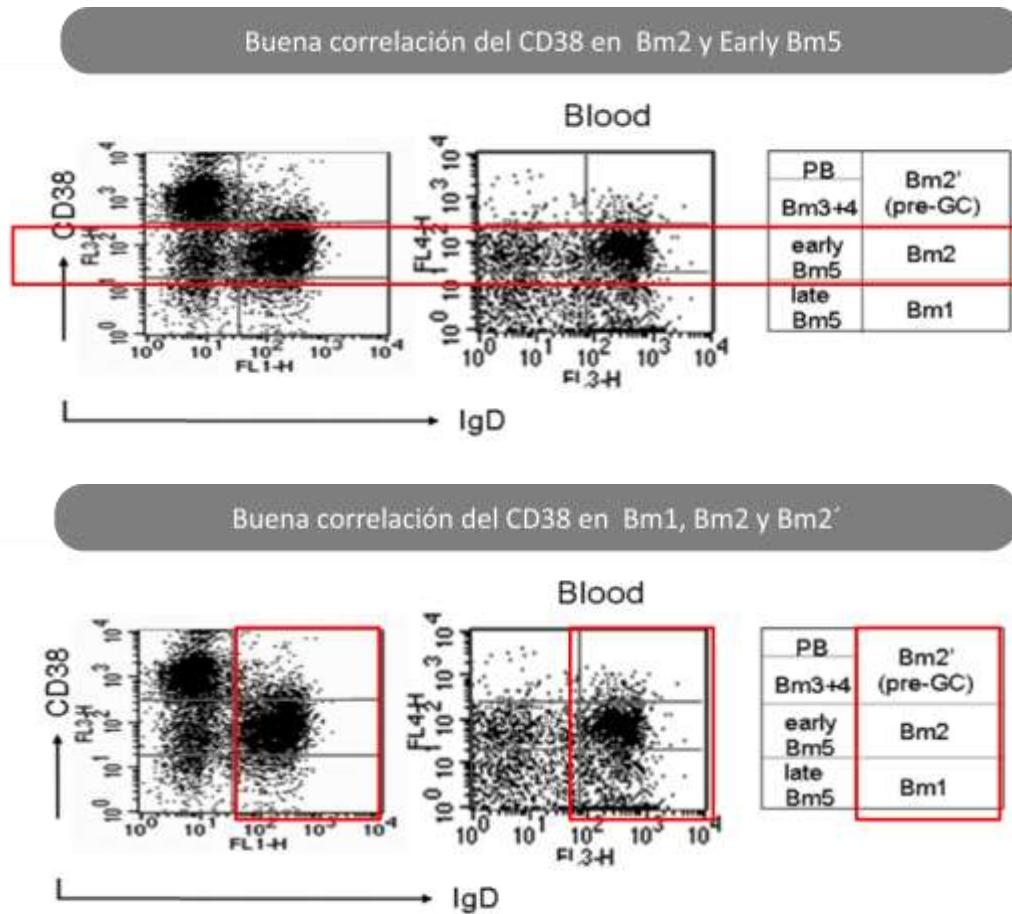
**Tabla 27:** se observan los valores de Alfa de Cronbach, matriz de correlación interelementos y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidad del fluorocromo IgD en cada una de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como "gold standard" (SF).

	Alfa de cronbach	Coefficiente de Correlación intraclase	Sig.
IgD.BM1.SF_FM	0,989	0,989	0
IgD.BM1.SF_LYSIS	0,985	0,983	0
IgD.BM1.SF_SF24H	0,971	0,967	0
IgD.BM2.SF_FM	0,997	0,997	0
IgD.BM2.SF_LYSIS	0,998	0,998	0
IgD.BM2.SF_SF24H	0,977	0,962	0
IgD.BM2P.SF_FM	0,988	0,987	0
IgD.BM2P.SF_LYSIS	0,99	0,99	0
IgD.BM2P.SF_24H	0,985	0,975	0
IgD.BM3y4.SF_FM	0,712	0,713	0
IgD.BM3y4.SF_LYSIS	0,783	0,763	0
IgD.BM3y4.SF_24H	0,726	0,683	0
IgD.EarlyBM5.SF_FM	0,982	0,983	0
IgD.EarlyBM5.SF_LYSIS	0,981	0,98	0
IgD.EarlyBM5.SF_24H	0,991	0,991	0
IgD.LateBM5.SF_FM	0,752	0,755	0
IgD.LateBM5.SF_LYSIS	0,668	0,651	0
IgD.LateBM5.SF_24H	0,69	0,667	0



**Gráfico 6:** En el eje de ordenadas se representa el coeficiente de correlación. En el eje de abscisas se representan la intensidad de fluorescencia del fluorocromo IgD en las distintas subpoblaciones linfocitarias tipo B (Bm1, Bm2, Bm2p, Bm3y4, EarlyBm5 y LateBm5) cuando se comparan los procedimientos en estudio (FM, Lysis y SF24h) con la prueba "gold standard" (Sangre Fresca representada con las siglas SF).

Sirva esta figura para ilustrar lo comentado líneas atrás.



Finalmente, se han fusionado todos los resultados de las distintas subpoblaciones linfocitarias, agrupadas según las dos clasificaciones linfocitarias estudiadas: (1) **Clasificación Euroclass** (con IgD y CD27) y **B mature** (con IgD y CD38), observándose como en todos los casos, excepto el fluorocromo CD38 en la clasificación B mature, según los procesamientos de muestras FM y 24h (donde se obtuvo un CCI de 0,883 y 0,817, respectivamente), la correlación es muy buena (CCI>0,9). Por todo ello, podemos concluir que LA INTENSIDAD DE SEÑAL NO SE VE AFECTADA EN NINGUNO DE LOS TRES PROCESAMIENTOS DE MUESTRA UTILIZADOS, CON UN CCI MAYOR DE 0,9; LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON CADA UNO DE ESTOS PROCESAMIENTOS SERÍAN MUY FIABLES Y SIMILARES A LOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA “GOLD STANDARD” (MUESTRA SANGUÍNEA PROCESADA A LOS POCOS MINUTOS DE SU EXTRACCIÓN).

**Tabla 30:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos IgD, CD27 y ambos unidos (IgD/CD27), para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B según la Clasificación EuroClass, cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como "gold standard" (SF).

	Alfa de Cronbach	Coefficiente de Correlación intraclase	Sig.
<b>IgD.Euroclass.SF_FM</b>	0,994	0,994	0
<b>IgD.Euroclass.SF_Lysis</b>	0,999	0,998	0
<b>IgD.Euroclass.SF_24h</b>	0,98	0,977	0
<b>CD27.Euroclass.SF_FM</b>	0,989	0,989	0
<b>CD27.Euroclass.SF_Lysis</b>	0,992	0,991	0
<b>CD27.Euroclass.SF_24h</b>	0,997	0,967	0
<b>IgD/CD27.Euroclass.SF_FM</b>	0,994	0,994	0
<b>IgD/CD27.Euroclass.SF_Lysis</b>	0,998	0,998	0
<b>IgD/CD27.Euroclass.SF_24h</b>	0,98	0,978	0

**Tabla 31:** se observan los valores de Alfa de Cronbach y el coeficiente de correlación intraclase (con su nivel de significación añadido), de la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos IgD, CD38 y ambos unidos (IgD/CD38), para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B según la Clasificación Bmature, cuando se comparan los distintos procesamientos de muestras (FM, Lysis y SF24h) con el procesamiento designado como "gold standard" (SF).

	Alfa de Cronbach	coeficiente de Correlación intraclase	Sig.
<b>CD38.Bmature.SF_FM</b>	0,883	0,881	0
<b>CD38.Bmature.SF_Lysis</b>	0,923	0,922	0
<b>CD38.Bmature.SF_24h</b>	0,817	0,677	0
<b>IgD.Bmature.SF_FM</b>	0,995	0,995	0
<b>IgD.Bmature.SF_Lysis</b>	0,996	0,996	0
<b>IgD.Bmature.SF_24h</b>	0,986	0,984	0
<b>CD38/IgD.Bmature.SF_FM</b>	0,939	0,939	0
<b>CD38/IgD.Bmature.SF_Lysis</b>	0,958	0,958	0
<b>CD38/IgD.Bmature.SF_24h</b>	0,908	0,902	0



## 6. CONCLUSIONES.

---

1. El porcentaje de marcadores expresados en la superficie celular (necesarias para la tipificación de las subpoblaciones linfocitarias) no se ve afectada por el tipo de procesamiento de muestra utilizado: *SF*, *SF24h*, *FM* y *Lysis*.

2. La intensidad de fluorescencia de los fluorocromos utilizados no se ve afectada en ninguno de estos procedimientos.

3. Los resultados finales de expresión de marcadores de superficie no se ven influenciados por la combinación de los fluorocromos utilizados.

4. Como excepción de lo anterior, se podría observar mínimas modificaciones de algunas subpoblaciones con preparaciones concretas, que se recogen en el *anexo III*. Los gráficos de Bland y Altman para cada una de las subpoblaciones linfocitarias, cuando se comparan los 3 procedimientos en estudio respecto al “gold estándar”, proporcionan una herramienta para ver si los resultados se correlacionan en cada una de las situaciones mencionadas.

---

# 7. RESUMEN.

---

## 7.1. INTRODUCCIÓN.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. La citometría de flujo es una tecnología que permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. Estas medidas son realizadas mientras las células (partículas) pasan en fila, a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, a través del aparato de medida en una corriente de fluido.

El haz de luz láser cuando atraviesa una célula sufre una dispersión que puede ser evidenciada en un fotodetector, situado detrás de la corriente de células y justo enfrente de la fuente emisora, como una disminución de la luz incidente. El tiempo que dure el corte en la llegada de fotones al detector será proporcional al diámetro, y por tanto el volumen celular.

Además del detector de luz situado frente al haz láser, existe otro grupo óptico, el más importante, que detecta la luz dispersada por las células y que se coloca formando un ángulo de 90° con el haz láser. Esta luz es descompuesta, mediante los filtros apropiados para poder estudiar tanto la dispersión de luz de la misma longitud de onda del láser como la emitida por los fluorocromos. La mayor o menor dispersión de la luz y por tanto la mayor o menor detección de luz en este detector, será proporcional a la composición antigénica de la superficie celular, a las estructuras y organelas celulares.

La luz dispersa pasa a través de espejos que reflejan fotones hasta longitudes de onda determinadas y dejan continuar a los de longitud de onda mayor de manera que es posible descomponer la luz en varios rangos de longitudes de onda que nos permiten estudiar

Se utilizan, generalmente, inmunoglobulinas monoclonales contra antígenos concretos en la superficie de las células, marcadas con colorantes fluorescentes. El anticuerpo es enfrentado a las células, luego se lava y se procesa por el citómetro de flujo.

## 7.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

### 7.2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Los resultados en el estudio de *subpoblaciones linfocitarias tipo B*, obtenidos por citometría de flujo según los distintos procesamientos de muestra (en sangre periférica), se correlacionan con los obtenidos en la prueba Gold Standard (procesamiento de la muestra a las pocas horas de su extracción).

### 7.2.2. OBJETIVOS.

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Demostrar que los resultados finales en el estudio por citometría de flujo de las subpoblaciones linfocitarias tipo B, son similares en estos 4 procedimientos de muestra (sangre periférica) empleados.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS.**

Conocer qué métodos de procesamiento de muestras (sangre periférica) son los que originan resultados más fiables de cara a la evaluación de las subpoblaciones linfocitarias tipo B obtenidas por citometría de flujo.

Se realizará una citometría inicial con marcaje específico para células B, realizada a los pocos minutos de la extracción sanguínea; siendo este procesamiento el “*Gold Standard*” de nuestro estudio, dado que de este modo, la muestra no sufre alteraciones en su estructura celular ni en la superficie. Después, se compararán con esta prueba basal, los resultados obtenidos con el resto de procesamientos (un total de 3) y así determinar si existe variación estadísticamente significativa en los resultados finales.

Se pretende conocer cuáles son las subpoblaciones linfocitarias tipo B que más se ven afectadas en cada uno de los procesamientos de muestra.

A su vez, dado que este estudio se realizará sobre población sana, se determinará la media/mediana de las distintas subpoblaciones de linfocitos B según los dos clasificaciones utilizadas: (1) **THE FREIBURG, PARIS AND EUROCLASS CLASSIFICATIONS**: DN, Naive, Unswitched memory y Switched memory; (2) **Clasificación B mature**: Bm1, Bm2, Bm2', Bm3y4, Early Bm5 y Late Bm5.

Por otra parte, dado que los marcadores de superficie son fluorocromos y su utilidad viene dada debido a que emiten una intensidad de señal luminosa, en un estudio paralelo se intenta evaluar la medias/medianas de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los fluorocromos utilizados para el estudio de subpoblaciones linfocitarias tipo B (CD19, CD38, IgD, CD3 y CD19) y, de este modo, conocer las diferencias obtenidas de acuerdo con el procesamiento de muestra utilizado. De igual modo, se intentará conocer qué procesamiento de muestra es el que produce mayor alteración en la señal de intensidad lumínica de cada uno de los fluorocromos.

## **7.3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.3.1. SUJETOS DEL ESTUDIO.**

Se estudiaron 50 sujetos sanos donantes de sangre, a los que se le realizó extracción sanguínea por vía venosa periférica.

#### **7.3. 1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

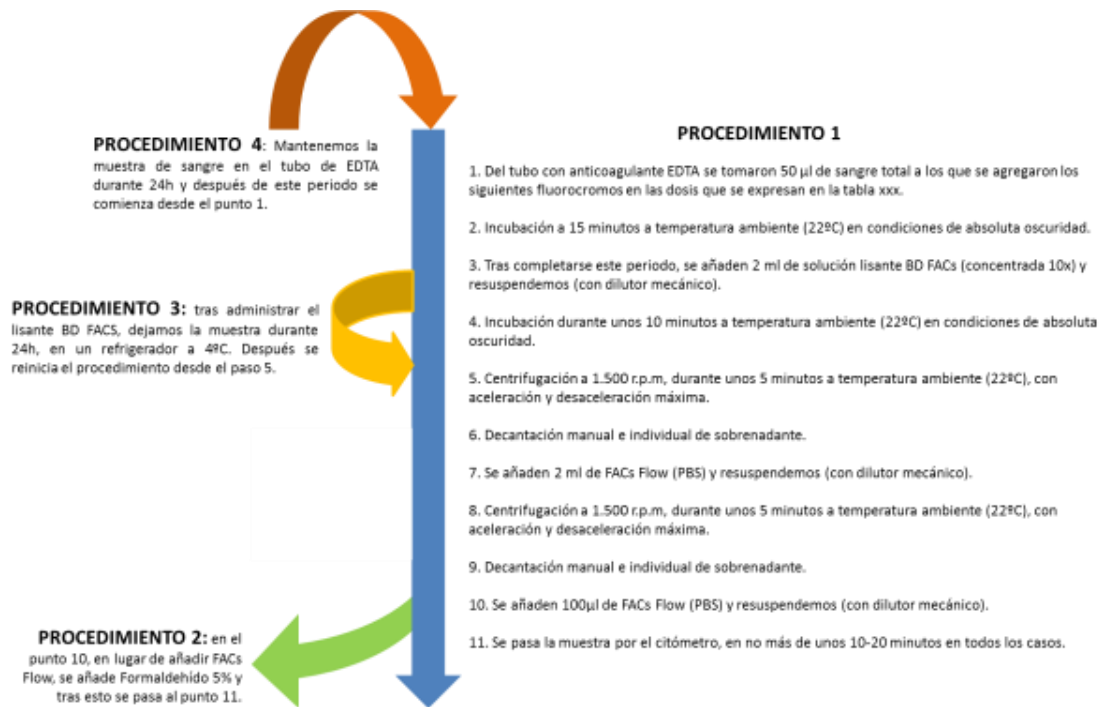
- Aceptación y firma del consentimiento informado por escrito del paciente.
- Ambos sexos.
- Edad entre 18-65 años.
- Analítica general (bioquímica, orina y hemograma), análisis de autoinmunidad (FR, anti-CCP, HLA B27, ANAs, Anti-DNA, ENAs, ANCAs y ECA) junto con serología normal.

#### **7.3.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

Padecer alguna enfermedad causa de linfocitosis y/o linfopenia.

### **7.3.2. MÉTODOS.**

Según podemos observar en el *diagrama* aclaratorio de más abajo, nos encontramos con 4 procedimientos, en el que el procedimiento 1 es el considerado como “gold standard”. La sangre es directamente procesada desde el momento de su extracción sanguínea. Los otros tres procedimientos varían en cuanto a las sustancias utilizadas y los tiempos empleados.



## 7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Si dividimos el estudio en los dos grupos de subpoblaciones linfocitarias estudiadas: (1) Clasificación Euroclass y (2) Clasificación B mature, se observan que en todos los casos el Alfa de Cronbach y el Coeficiente de Correlación Intraclase superan los 0,9. Por tanto, LOS TRES PROCESAMIENTOS DE MUESTRA EN ESTUDIO APORTAN DATOS CON UNA FIABILIDAD MUY ALTA Y, POR TANTO, EXTRAPOLABLES A LOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA GOLD STANDARD.

En cuanto a la intensidad de la fluorescencia de los distintos fluorocromos, agrupados según las dos clasificaciones linfocitarias estudiadas: (1) Clasificación Euroclass (con IgD y CD27) y B mature (con IgD y CD38), se observa como en todos los casos, la correlación es muy buena ( $CCI > 0,9$ ). Por todo ello, podemos concluir que LA INTENSIDAD DE SEÑAL NO SE VE AFECTADA EN NINGUNO DE LOS TRES PROCESAMIENTOS DE MUESTRA UTILIZADOS ( $CCI > 0,9$ ); LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON CADA UNO DE ESTOS PROCESAMIENTOS SERÍAN MUY FIABLES Y SIMILARES A LOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA GOLD STANDARD (MUESTRA SANGUÍNEA PROCESADA A LOS POCOS MINUTOS DE SU EXTRACCIÓN).

## 7.5. CONCLUSIONES.

El porcentaje de marcadores expresados en la superficie celular (necesarias para la tipificación de las subpoblaciones linfocitarias) no se ve afectada por el tipo de procesamiento de muestra utilizado: SF, SF24, FM y Lysis. Del mismo modo, la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos utilizados no se ve afectado por el tipo de procesamiento utilizado.

Además del método de preparación de la muestra (sangre periférica) los resultados finales de expresión de marcadores de superficie no se ven influenciados por la combinación de los fluorocromos utilizados.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. OMS (1958). Comité de expertos en rehabilitación médica. Primer informe. Ginebra. Ed. Organización Mundial de la Salud. Informes técnicos, nº 158.
2. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clinical Immunology Newsletter* 1990;19:49-55.
3. Kidd PG, Vogt RF. Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clinical Immunol Immunopathol* 1989;52:3-9.
4. Asbury CL, Esposito R, Farmer C, van den Engh G. Fluorescence spectra of DNA dyes measured in a flow cytometer. *Cytometry* 1996;24:234-42.
5. Kałwak K, Turkiewicz D, Ussowicz M, et al. Clinical value of the flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation: spontaneous activation of T-cell subpopulations is associated with acute GvHD. *Transplantation Proceedings* 2003;35:1559-62.
6. Cotteret S, Belloc F, Boiron JM, et al. Fluorescent in situ hybridization on flow-sorted cells as a tool for evaluating minimal residual disease or chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Cytometry* 1998;34:216-22.
7. Dai S-M, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  production induced by direct contact with T lymphocytes: Implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004;50:432-43.
8. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006;65:553-4.
9. De Paoli P, Reitano M, Battistin S, Castiglia C, Santini G. Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 1984;72:349-53.
10. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, et al. Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates with Clinical Aspects. *Journal of Clinical Immunology* 2003;23:385-400.
11. Warnatz K, Denz A, Dräger R, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99:1544-51.
12. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111:77-85.
13. Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *The Journal of Immunology* 2001;167:3610-8.
14. Sanz I, Wei C, Lee FE-H, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology* 2008;20:67-82.
15. Grammer AC, Lipsky PE. CD154–CD40 interactions mediate differentiation to plasma cells in healthy individuals and persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46:1417-29.
16. Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods* 1989;118:209-15.

17. Renzi P, Ginns LC. Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1987;98:53-6.
18. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods* 1992;154:7-10.
19. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;52:48-60.
20. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1988;37:377-82, 87-8.
21. *Protection of Laboratory Workers from infectious Disease Transmitted by Blood BF, and Tissue: Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2. .
22. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline*. Villanova PNCfCLSNdH-T.
23. *Standard. PftcodbsbVA*, Standards; VPNCfCL, 1991., H3-A3. Nd.
24. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol* 1985;3:33-7.
25. Nicholson JK, Rao PE, Calvelli T, et al. Artifacts staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. *Cytometry* 1994;18:140-6.
26. Blattner FR, Tucker PW. The molecular biology of immunoglobulin D. *Nature* 1984;307:417-22.
27. van der Meer JW, Vossen JM, Radl J, et al. Hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever: a new syndrome. *Lancet* 1984;1:1087-90.
28. Arnaud P, Dechavanne M, Creyssel R. Metabolism of human monoclonal immunoglobulin D. A study in two patients with monoclonal IgD gammopathy. *Biomedicine* 1974;21:77-81.
29. Spiegelberg HL. The structure and biology of human IgD. *Immunol Rev* 1977;37:3-24.
30. White MB, Shen AL, Word CJ, Tucker PW, Blattner FR. Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain. *Science* 1985;228:733-7.
31. Van Boxel JA, Paul WE, Terry WD, Green I. Communications. IgD-bearing human lymphocytes. *J Immunol* 1972;109:648-51.
32. Litwin SD, Zehr BD. In vitro studies on human IgD. I. Sources and characteristics of "externalized" IgD in tonsil lymphocyte cultures. *Eur J Immunol* 1987;17:483-9.
33. Climent Barberá JM. Historia de la Rehabilitación. De la medicina física a la atención de la discapacidad. 2ªed. Barcelona: Edikamed;2009. P. 245-250.
34. Litwin SD, Zehr BD. In vitro studies on human IgD. II. IgD-secreting cells preferentially elaborate IgD, lambda molecules. *Eur J Immunol* 1987;17:491-5.
35. Litzman J, Ward AM, Wild G, Znojil V, Morgan G. Serum IgD levels in children under investigation for and with defined immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:54-8.
36. Nicholson IC, Brisco MJ, Zola H. Memory B lymphocytes in human tonsil do not express surface IgD. *J Immunol* 1995;154:1105-13.
37. Tisch R, Roifman CM, Hozumi N. Functional differences between immunoglobulins M and D expressed on the surface of an immature B-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6914-8.
38. Wu Y, Lakshmi Tamma SM, Lima V, Coico R. Facilitated antigen presentation by B cells expressing IgD when responding T cells express IgD-receptors. *Cell Immunol* 1999;192:194-202.

39. Moskophidis D, Moskophidis M, Lohler J. Virus-specific IgD in acute viral infection of mice. *J Immunol* 1997;158:1254-61.
40. Hiemstra I, Vossen JM, van der Meer JW, Weemaes CM, Out TA, Zegers BJ. Clinical and immunological studies in patients with an increased serum IgD level. *J Clin Immunol* 1989;9:393-400.
41. Tamura H, Fujinaga T, Kuroume T. IgD antibody to *Mycoplasma pneumoniae* in human sera as measured by the RAST. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982;69:335-9.
42. Salonen EM, Hovi T, Meurman O, Vesikari T, Vaheri A. Kinetics of specific IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM antibody responses in rubella. *J Med Virol* 1985;16:1-9.
43. Sewell HF, Chambers L, Maxwell V, Matthews JB, Jefferis R. The natural antibody response to *E. coli* includes antibodies of the IgD class. *Clin Exp Immunol* 1978;31:104-10.
44. Forsgren A, Grubb AO. Many bacterial species bind human IgD. *J Immunol* 1979;122:1468-72.
45. Kikindjanin V. IgD values in children suffering from acute, recurrent and chronic respiratory diseases. *Allerg Immunol (Leipzig)* 1981;27:203-6.
46. Buckley RH, Fiscus SA. Serum IgD and IgE concentrations in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest* 1975;55:157-65.
47. McFarlin DE, Strober W, Waldmann TA. Ataxia-telangiectasia. *Medicine (Baltimore)* 1972;51:281-314.
48. Mizuma H, Litwin S, Zolla-Pazner S. B-cell activation in HIV infection: relationship of spontaneous immunoglobulin secretion to various immunological parameters. *Clin Exp Immunol* 1988;71:410-6.
49. Leslie GA, Martin LN. Structure and function of serum and membrane immunoglobulin D (IgD). *Contemp Top Mol Immunol* 1978;7:1-49.
50. Geny B, Griscelli C, Mozziconacci P. Immunoglobulin D (IgD) in childhood. II. Serum IgD levels in juvenile rheumatoid arthritis. *Biomedicine* 1974;20:125-30.
51. Luster MI, Leslie GA, Bardana EJ. Structure and biological functions of human IgD. VII. IgD antinuclear antibodies in sera of patients with autoimmune disorders. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976;52:212-8.
52. Devey M, Sanderson CJ, Carter D, Coombs RR. IgD antibody to insulin. *Lancet* 1970;2:1280-3.
53. Peng Z, Fisher R, Adkinson NF, Jr. Total serum IgD is increased in atopic subjects. *Allergy* 1991;46:436-44.
54. Bahna SL, Heiner DC, Myhre BA. Changes in serum IgD in cigarette smokers. *Clin Exp Immunol* 1983;51:624-30.
55. Corte G, Ferraris AM, Rees JK, Bargellesi A, Hayhoe FG. Correlation of serum IgD level with clinical and histologic parameters in Hodgkin disease. *Blood* 1978;52:905-10.
56. Amlot PL, Green L. Serum immunoglobulins G, A, M, D and E concentrations in lymphomas. *Br J Cancer* 1979;40:371-9.
57. Kumano Y, Nagato T, Kurihara K, et al. Hyperimmunoglobulinemia D in idiopathic retinal vasculitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;35:372-8.
58. Chen XY, Yi ZW, He QN. [Relationship between leukotrienes and clinical, pathological features of Henoch-Schoenlein purpura nephritis in children]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2008;46:272-5.
59. Miller RD, Gleich GJ, Offord KP, Dunnette SL. Immunoglobulin concentrations in serum and nasal secretions in chronic obstructive pulmonary disease. A matched-pair study. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:229-38.
60. Jancelewicz Z, Takatsuki K, Sugai S, Pruzanski W. IgD multiple myeloma. Review of 133 cases. *Arch Intern Med* 1975;135:87-93.
61. Blade J, Lust JA, Kyle RA. Immunoglobulin D multiple myeloma: presenting features, response to therapy, and survival in a series of 53 cases. *J Clin Oncol* 1994;12:2398-404.

62. Offord KP, Gleich GJ, Barbee RA, Dunnette SL, Miller RD. Serum IgD in subjects with and without chronic obstructive pulmonary disease: a previous finding restudied. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:118-20.
63. Ohtani H, Sakaguchi K, Saito M. Immunochemical studies on heterogeneity of IgD myeloma proteins. *Immunology* 1981;43:717-22.
64. Gastearena J, Fernandez FJ, Orue MT, Perez Equiza E, Uriz MJ, Rocha E. IgD plasma cell leukemia associated with pyroglobulinemia and pyroglobulinuria. *Clin Chim Acta* 1986;157:133-42.
65. Kinoshita T, Nagai H, Murate T, Saito H, Fukatsu T, Hotta T. IgD monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Int J Hematol* 1997;65:169-72.
66. Wang Y, Brooks SR, Li X, Anzelon AN, Rickert RC, Carter RH. The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines. *Immunity* 2002;17:501-14.
67. Fujimoto M, Poe JC, Satterthwaite AB, Wahl MI, Witte ON, Tedder TF. Complementary roles for CD19 and Bruton's tyrosine kinase in B lymphocyte signal transduction. *J Immunol* 2002;168:5465-76.
68. Deterre P, Berthelie V, Bauvois B, Dalloul A, Schuber F, Lund F. CD38 in T- and B-cell functions. *Chem Immunol* 2000;75:146-68.
69. Funaro A, Reinis M, Trubiani O, Santi S, Di Primio R, Malavasi F. CD38 functions are regulated through an internalization step. *J Immunol* 1998;160:2238-47.
70. Lee HC. Enzymatic functions and structures of CD38 and homologs. *Chem Immunol* 2000;75:39-59.
71. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996;10:1408-17.
72. Rodriguez-Alba JC, Moreno-Garcia ME, Sandoval-Montes C, Rosales-Garcia VH, Santos-Argumedo L. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. *Blood* 2008;111:3644-52.
73. Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990;20:2679-84.
74. Warnatz K, Denz A, Drager R, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99:1544-51.
75. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:591-619.
76. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 2006;24:133-9.
77. Ciszak L, Pawlak E, Kosmaczewska A, Potoczek S, Frydecka I. Alterations in the expression of signal-transducing CD3 zeta chain in T cells from patients with chronic inflammatory/autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007;55:373-86.
78. Hoffman RA. Standardization, calibration, and control in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2005;Chapter 1:Unit 1 3.
79. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
80. Bartko JJ. The intraclass correlation coefficient as a measure of reliability. *Psychol Rep* 1966;19:3-11.
81. Bland JM, Altman DG. Statistics notes: Cronbach's alpha. *BMJ* 1997;314:572.
82. Ekong T, Kupek E, Hill A, Clark C, Davies A, Pinching A. Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *Journal of Immunological Methods* 1993;164:263-73.
83. Ekong T HA, Gompels M, Brown A, Pinching AJ. The effect of the temperature and duration of sample storage on the measurement of lymphocyte subpopulations from HIV-1-positive and control subjects. *J Immunol Methods* 1992;151(1-2):217-25.



84. Lanier LL, Warner NL. Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *Journal of Immunological Methods* 1981;47:25-30.
85. Chow S, Hedley D, Grom P, Magari R, Jacobberger JW, Shankey TV. Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. *Cytometry Part A* 2005;67A:4-17.
86. Stewart CC, Behm FG, Carey JL, et al. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Selection of antibody combinations. *Cytometry* 1997;30:231-5.
87. Carey JL, Oldaker TA. More than Just Quality Control. *Clinics in Laboratory Medicine* 2007;27:687-707.
88. Paxton H, Bendele T. Effect of Time, Temperature, and Anticoagulant on Flow Cytometry and Hematological Values. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993;677:440-3.
89. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 2008;32:5-17.
90. Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2006;70B:39-44.
91. Shapiro HM. Frontmatter. In: *Practical Flow Cytometry*: John Wiley & Sons, Inc.; 2005:i-l.
92. Jennings CD, Foon KA. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood* 1997;90:2863-92.
93. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 1990;4:479-98.
94. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, et al. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Data analysis and interpretation. *Cytometry* 1997;30:236-44.
95. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124-34.
96. Sackett DL. The rational clinical examination. A primer on the precision and accuracy of the clinical examination. *JAMA* 1992;267:2638-44.
97. Latour J, Abraira V, Cabello JB, Lopez Sanchez J. [Investigation methods in clinical cardiology. IV. Clinical measurements in cardiology: validity and errors of measurements]. *Rev Esp Cardiol* 1997;50:117-28.
98. Clevenger CV, Bauer KD, Epstein AL. A method for simultaneous nuclear immunofluorescence and DNA content quantitation using monoclonal antibodies and flow cytometry. *Cytometry* 1985;6:208-14.
99. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1994;171:131-7.
100. Chilton NW, Fleiss JL. Design and analysis of plaque and gingivitis clinical trials. *J Clin Periodontol* 1986;13:400-10.
101. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
102. Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, et al. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry* 1992;13:68-74.
103. Marti GE, Magruder L, Patrick K, et al. Normal human blood density gradient lymphocyte subset analysis: I. An interlaboratory flow cytometric comparison of 85 normal adults. *American Journal of Hematology* 1985;20:41-52.

104. Schwartz A, FernÁNdez-Repollet E. Development of Clinical Standards for Flow Cytometry. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993;677:28-39.
  105. Islam D, Lindberg AA, Christensson B. Peripheral blood cell preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. *Cytometry* 1995;22:128-34.
  106. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2010;78B:S47-S60.
  107. Pati H, Jain S. Flow Cytometry in Hematological Disorders. *Indian J Pediatr* 2013;80:772-8.
-

## 9. ANEXOS.

---

## 9.1. ANEXO I.

# Clasificación THE FREIBURG, PARIS AND EUROCLASS CLASSIFICATIONS (IgD/CD27).

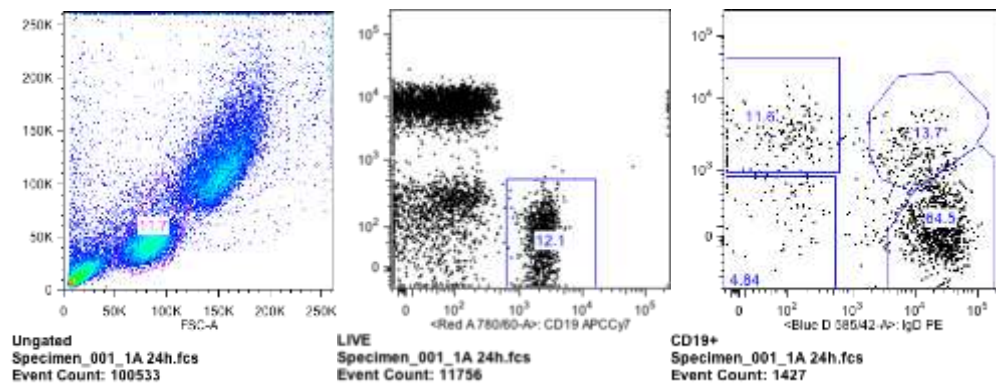
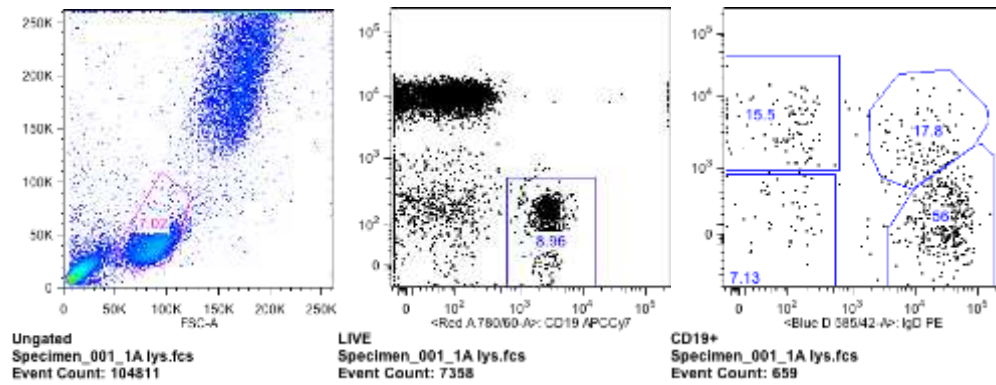
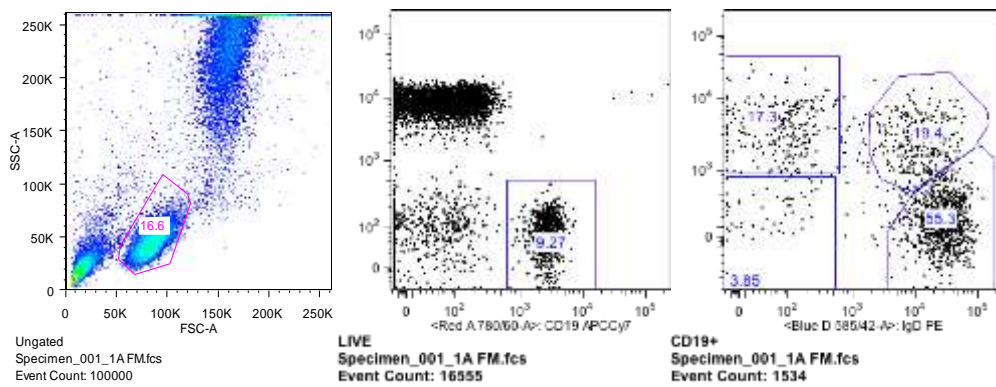
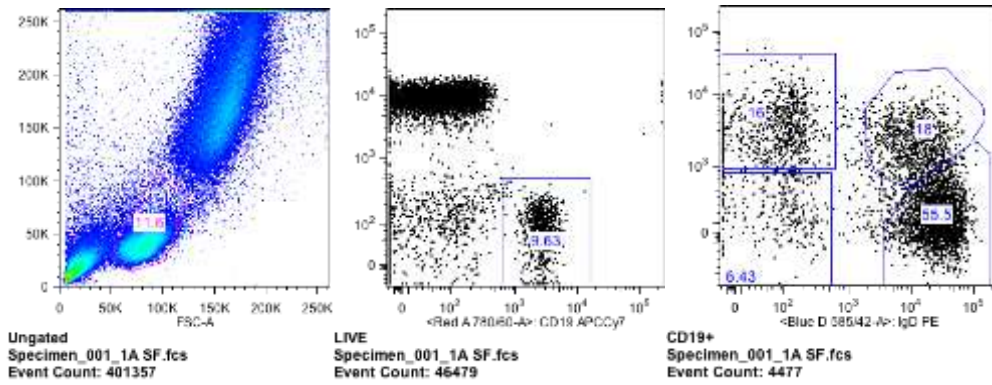
---

A continuación se adjuntan los resultados de la citometría de flujo realizada sobre todos los pacientes según los distintos procesamientos de muestras, en la Clasificación THE FREIBURG, PARIS AND EUROCLASS CLASSIFICATIONS (IgD/CD27) y más tarde la

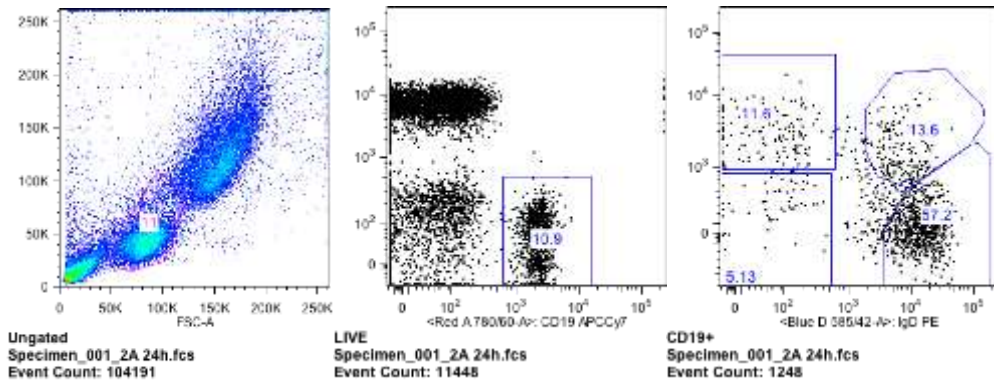
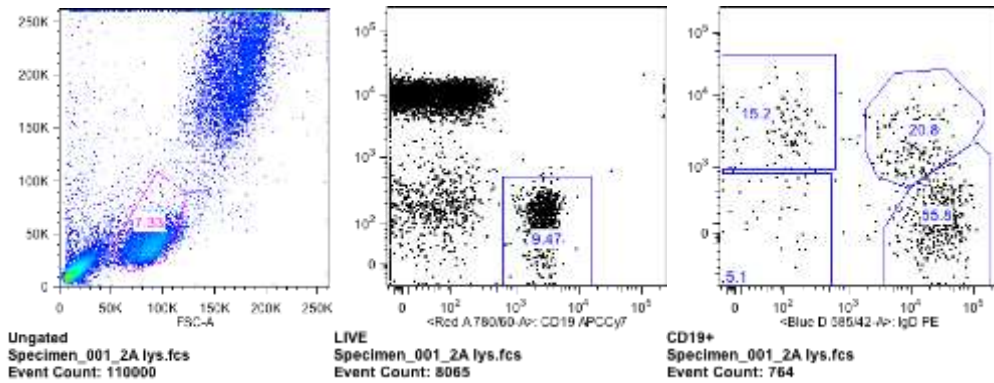
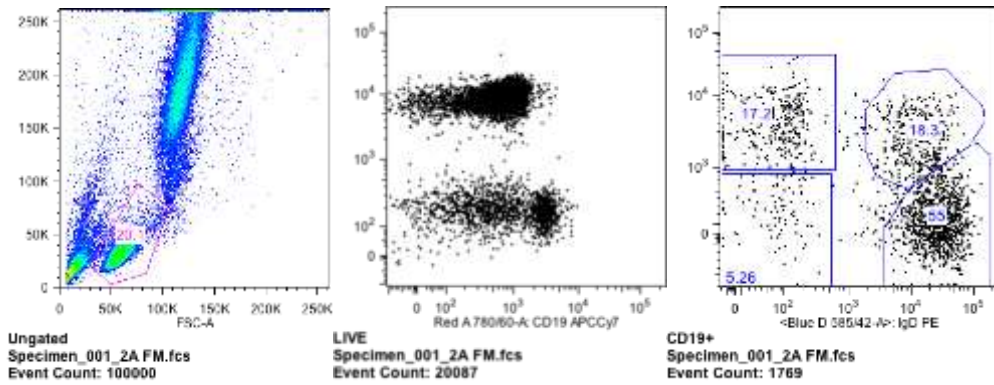
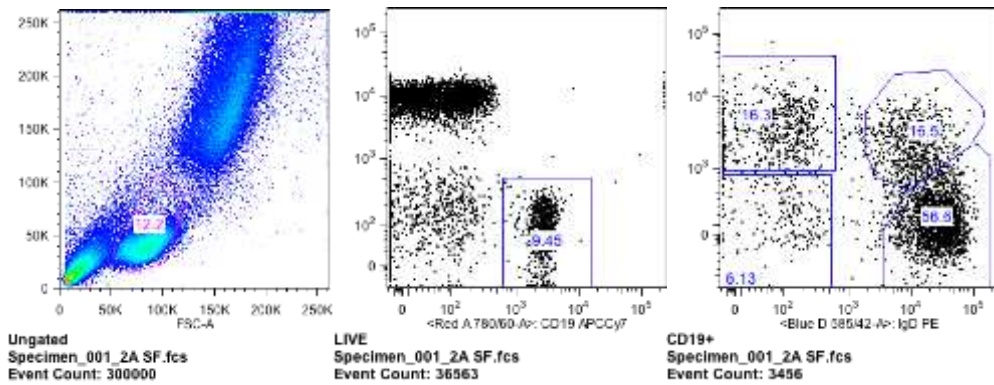
De este modo se reflejan a cada uno de los 50 pacientes (1-50), los resultados obtenidos por cada uno de los cuatro procedimientos en estudio.

**Nota aclaratoria:** (1) En rojo se expresan los plots que han sido incorrectamente valorados por el citómetro; obteniéndose resultados artefactados. (2) Con una cruz –x– se expresan aquellos plots, en los que debido a errores del citómetro no se han podido obtener resultado alguno.

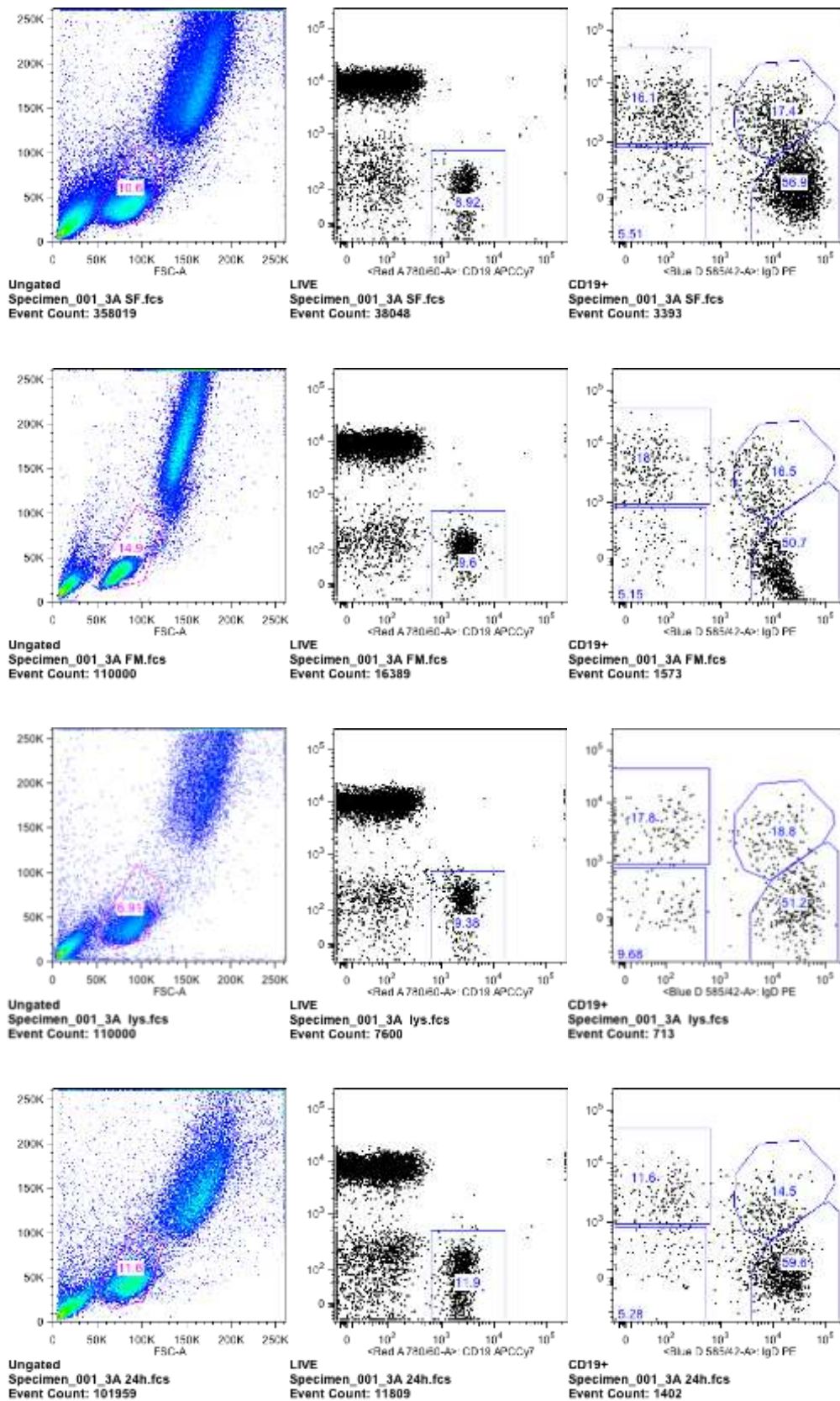
**SUJETO 1 (Clasificación IgD/CD27)**



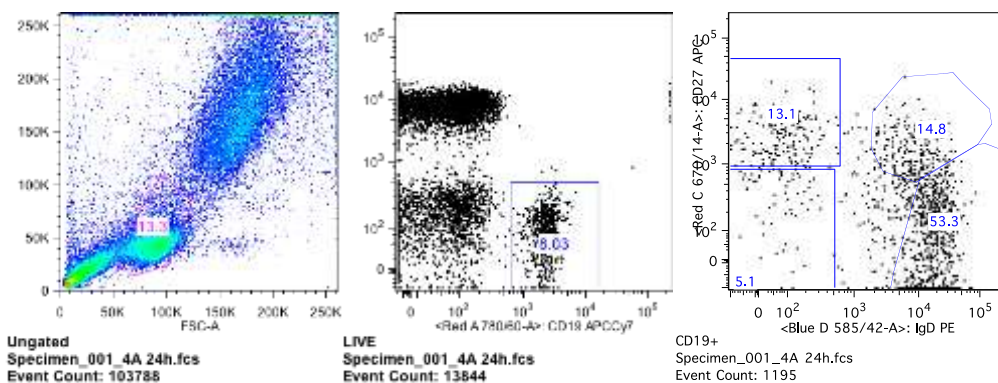
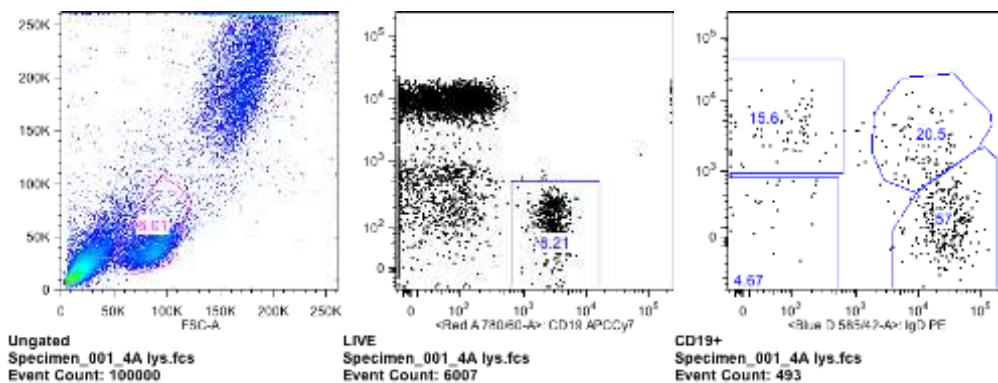
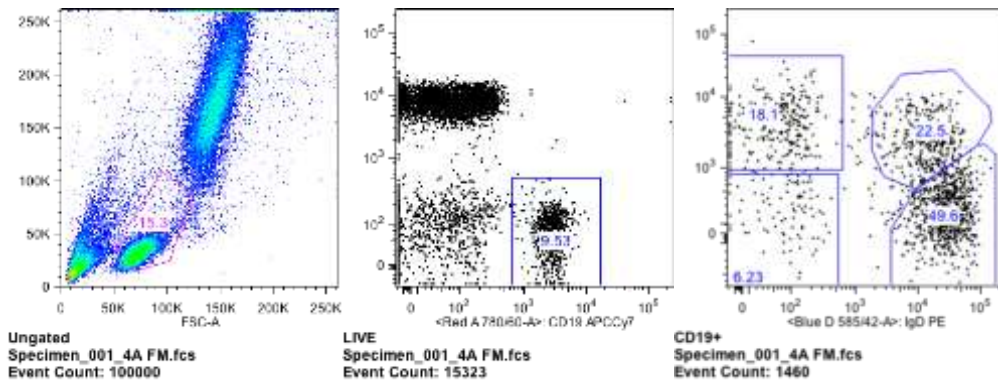
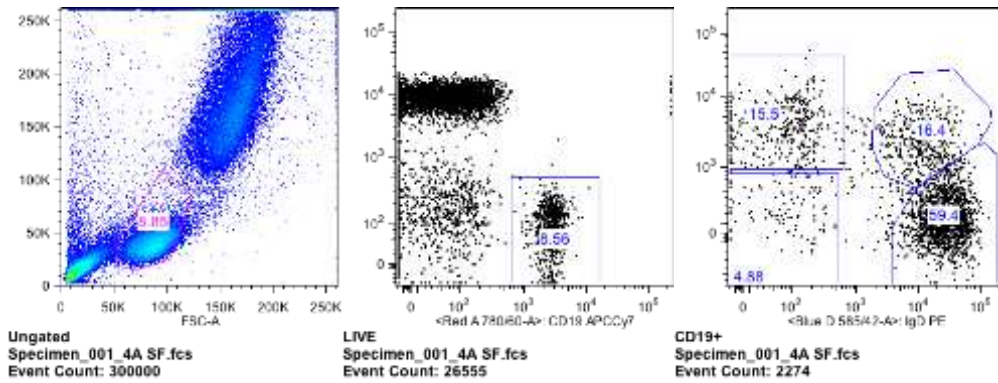
**SUJETO 2 (Clasificación IgD/CD27)**



### SUJETO 3 (Clasificación IgD/CD27)

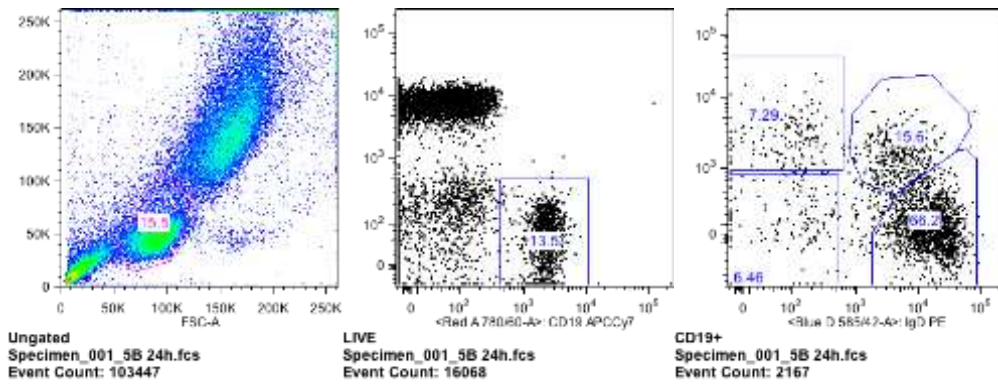
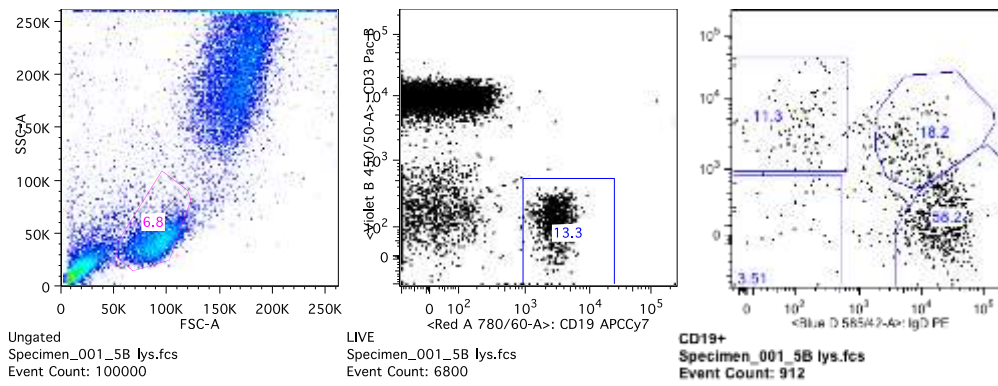
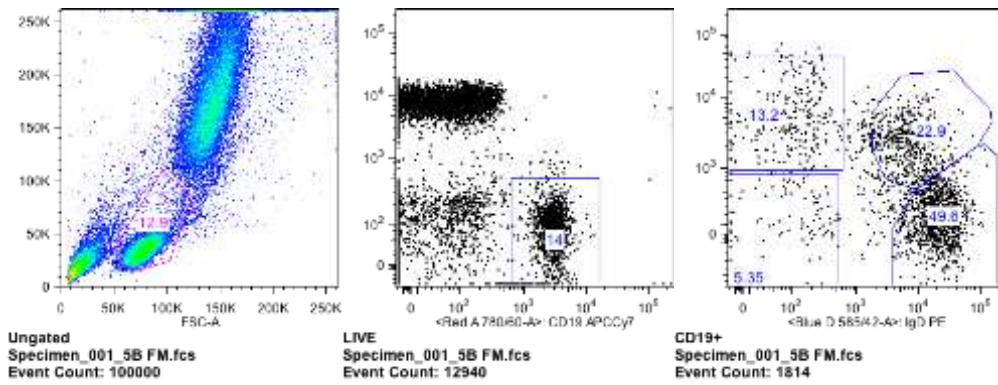
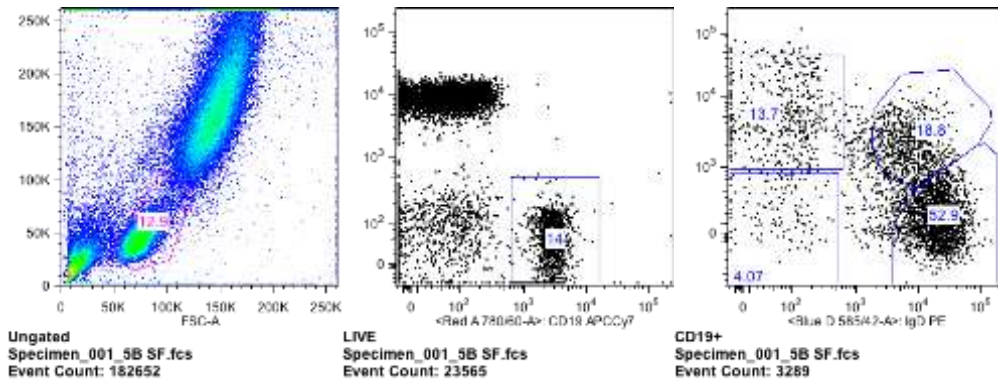


**SUJETO 4 (Clasificación IgD/CD27)**

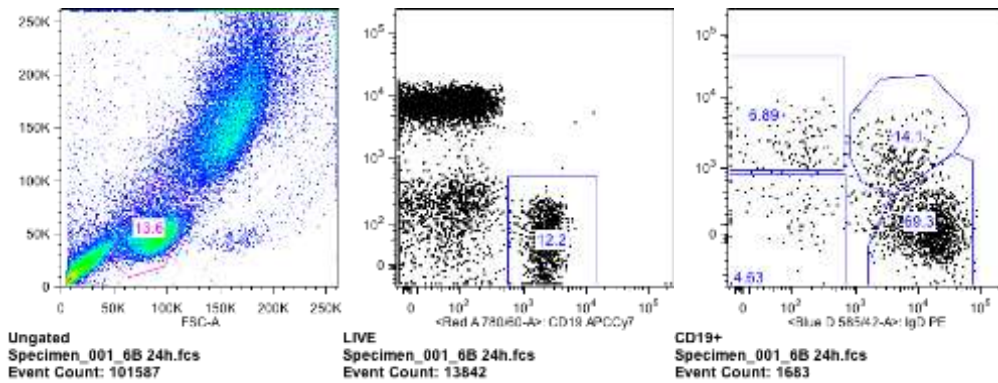
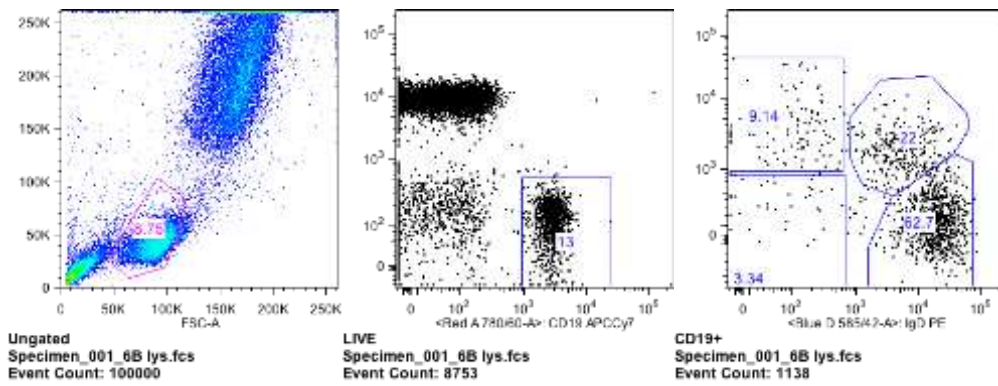
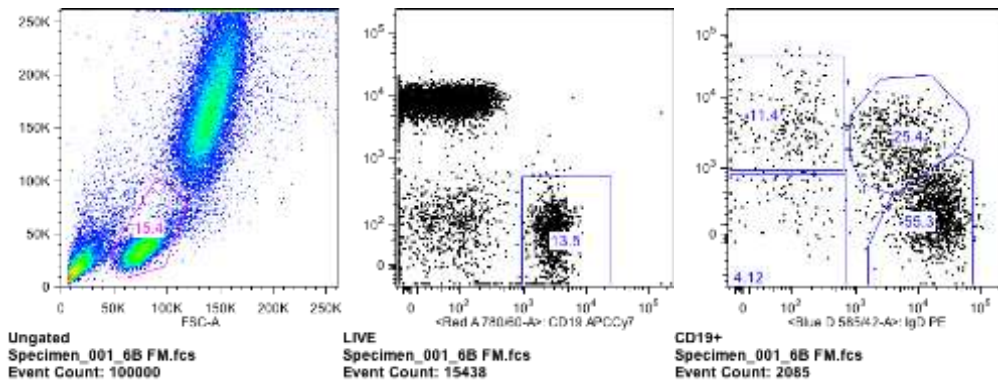
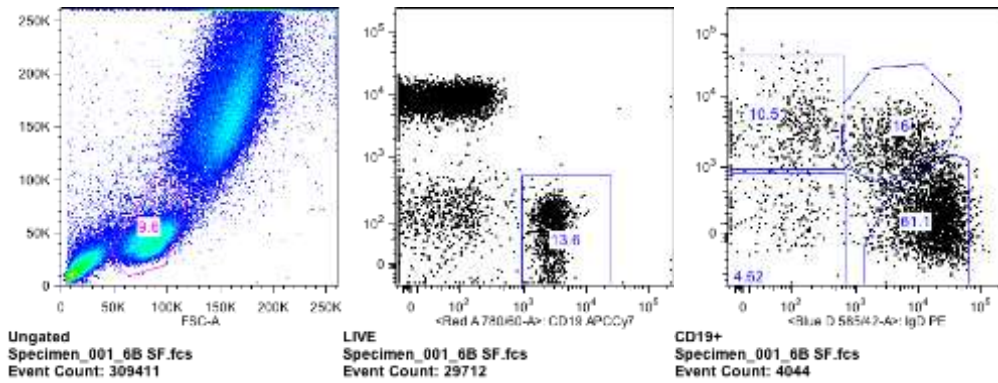




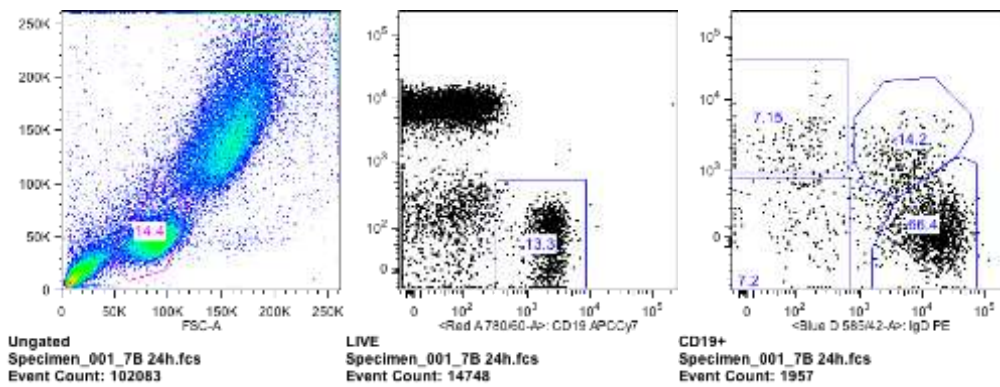
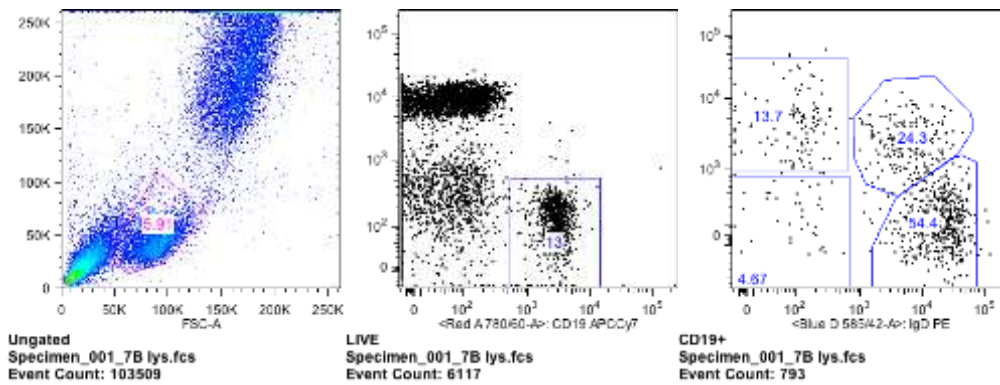
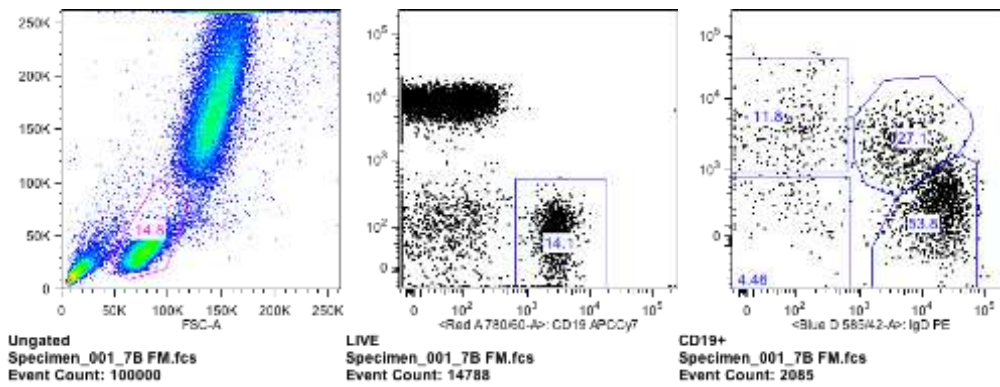
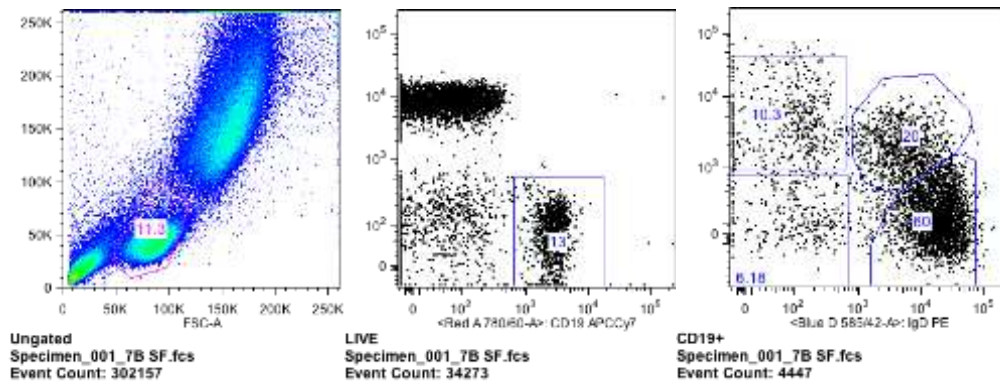
**SUJETO 5 (Clasificación IgD/CD27)**



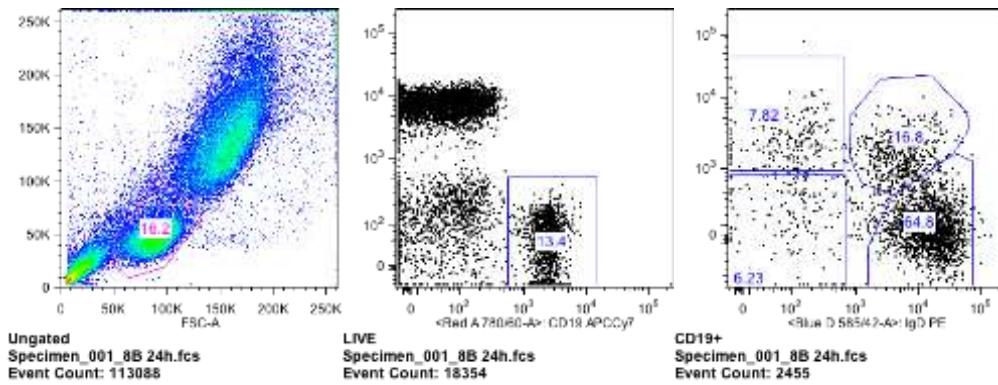
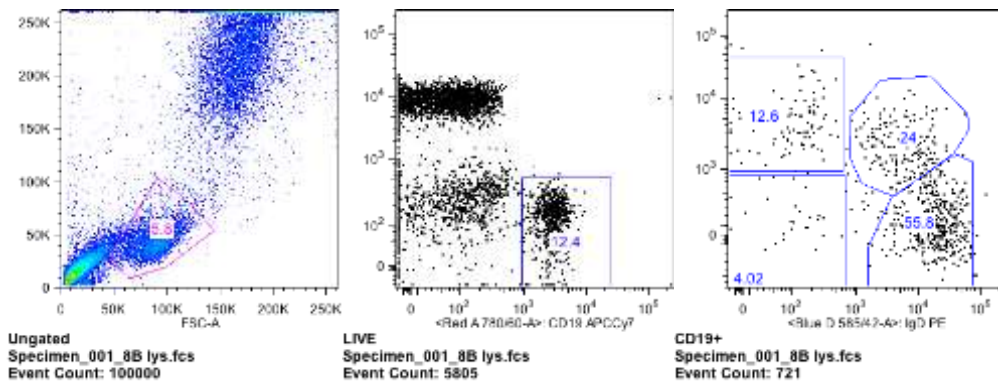
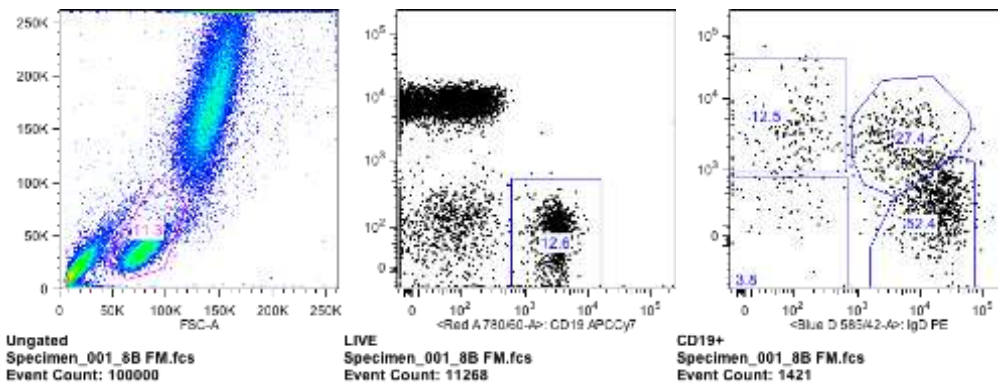
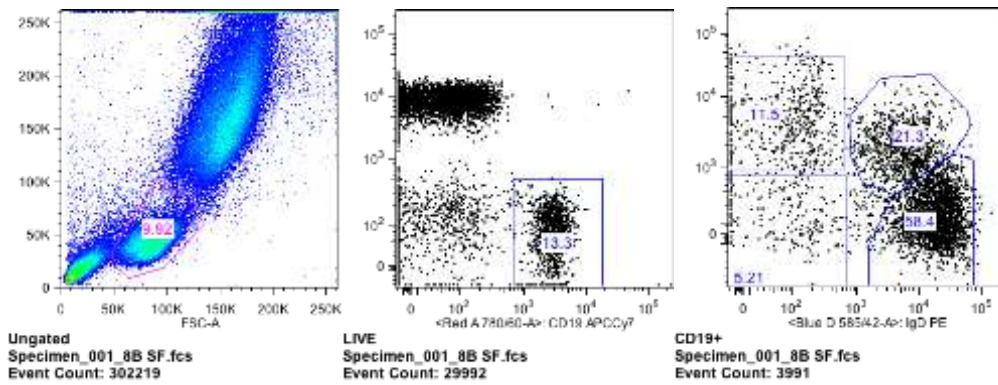
**SUJETO 6 (Clasificación IgD/CD27)**



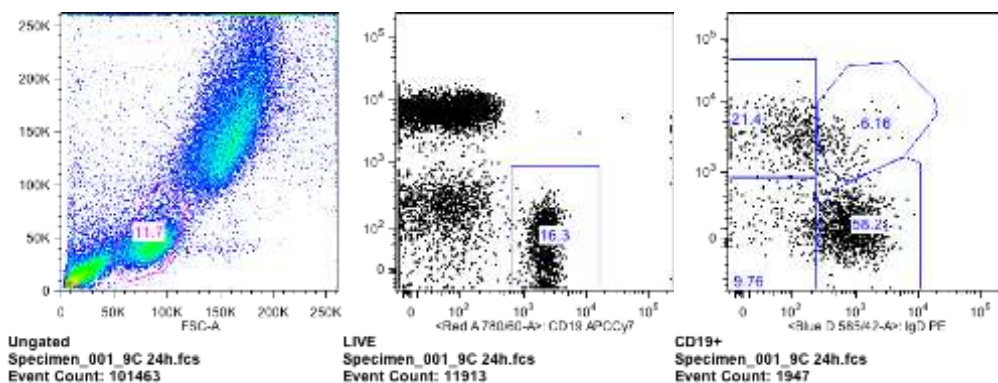
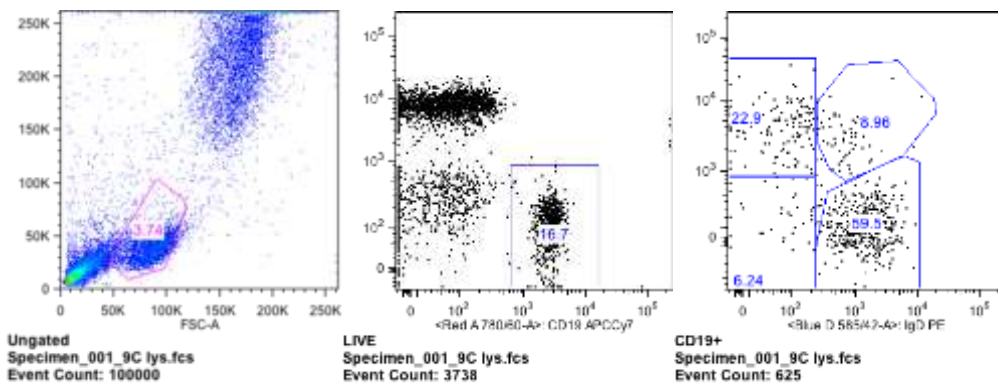
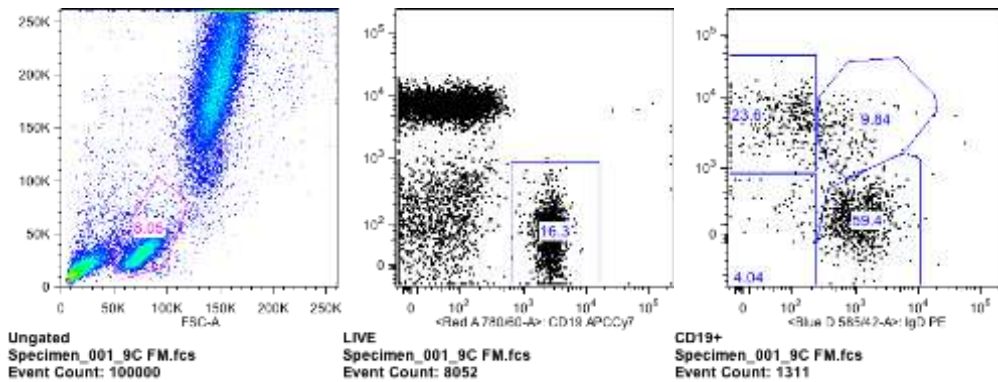
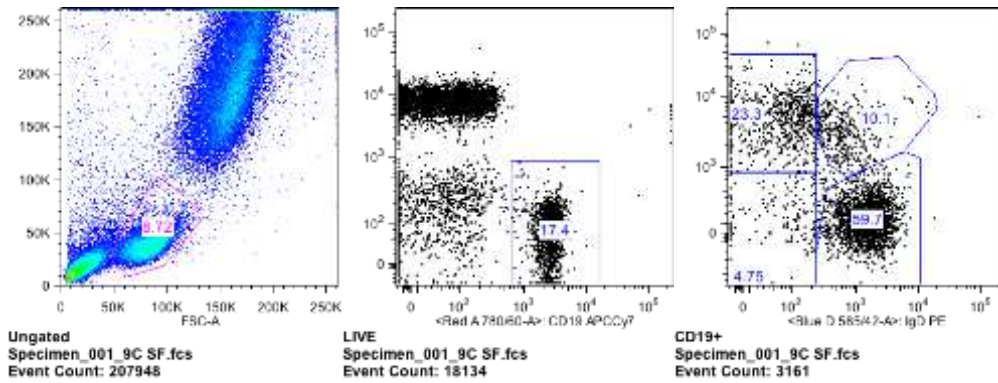
**SUJETO 7 (Clasificación IgD/CD27)**



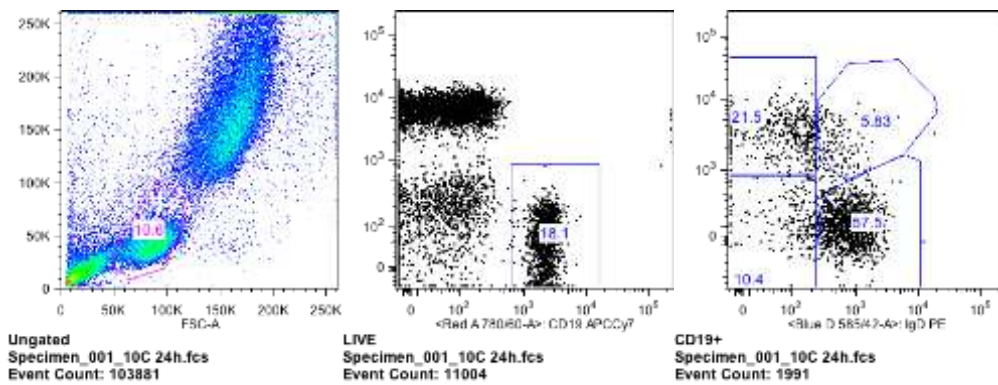
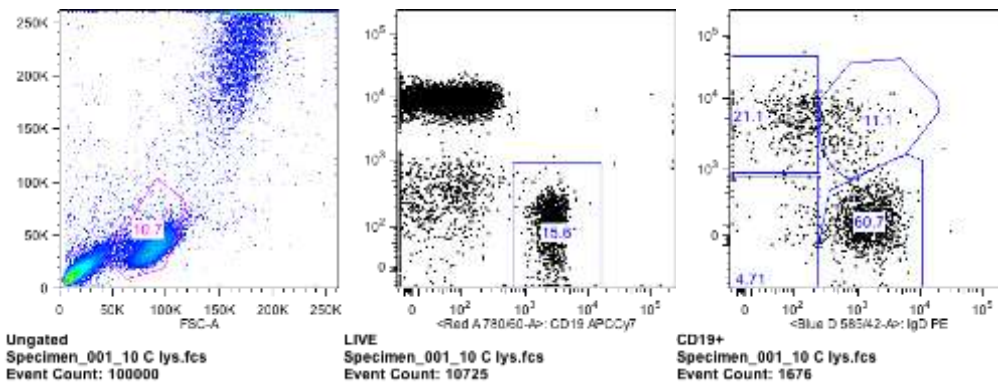
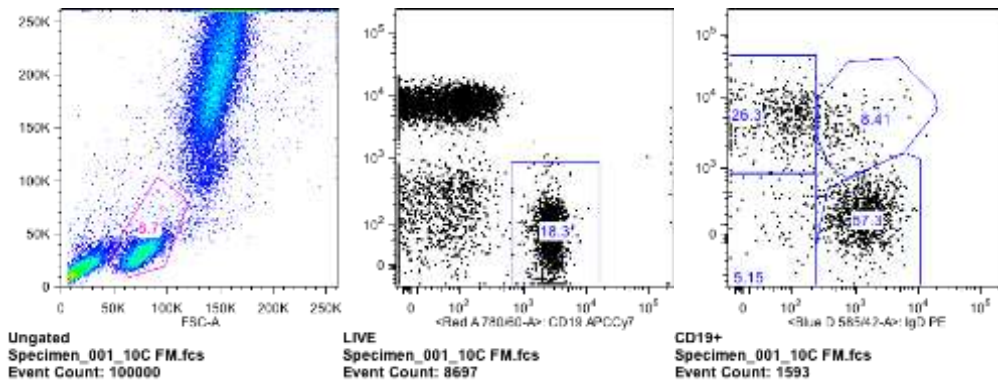
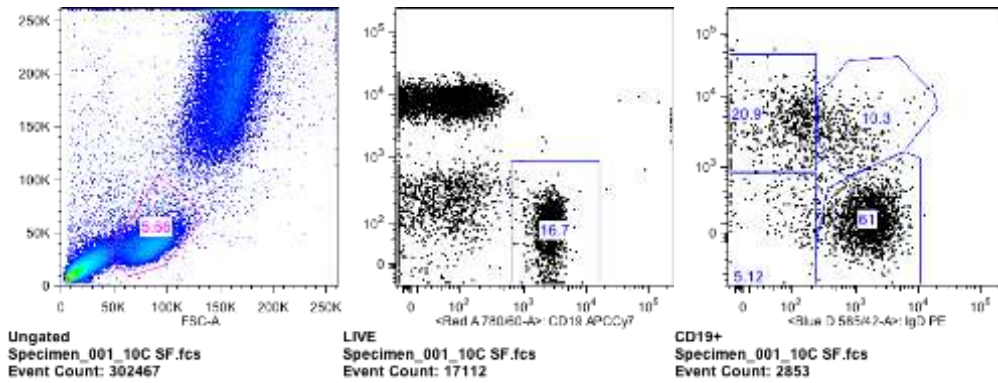
**SUJETO 8 (Clasificación IgD/CD27)**



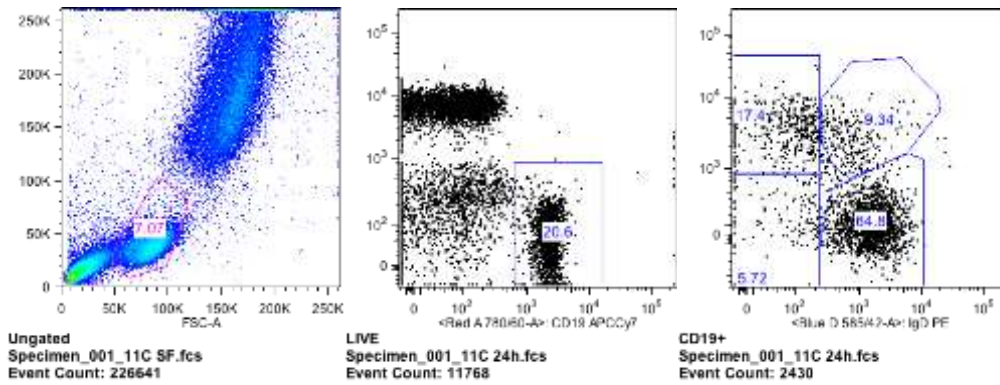
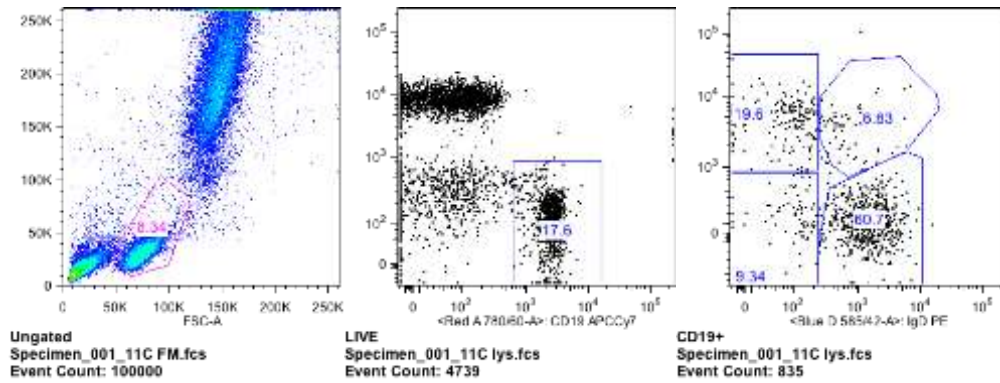
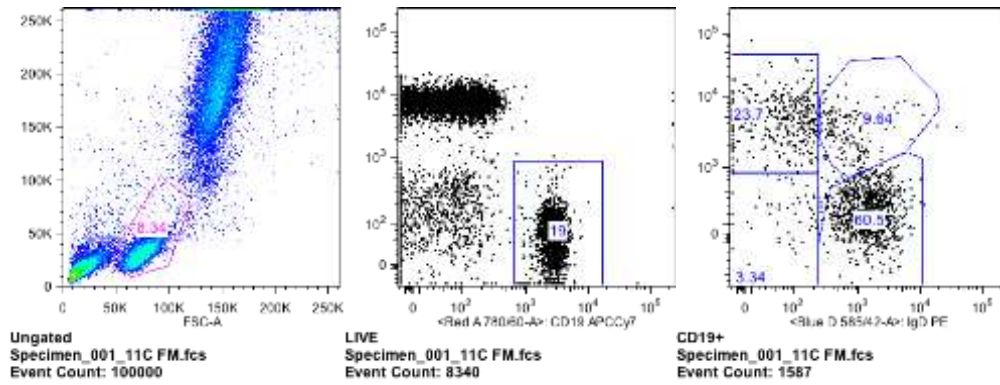
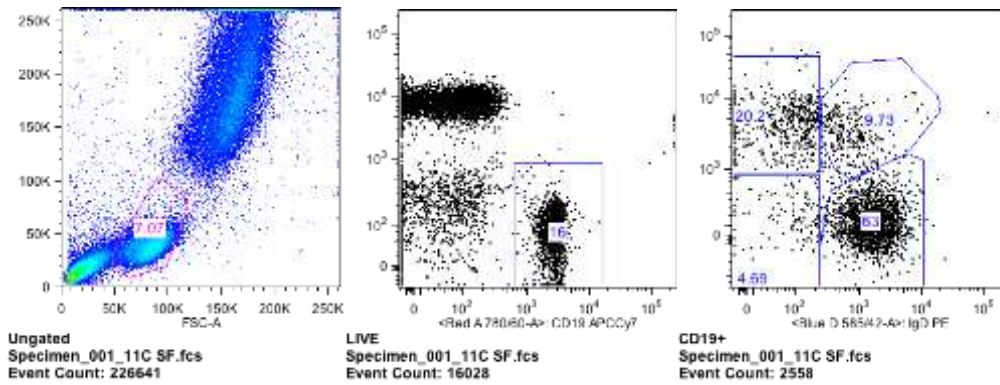
**SUJETO 9 (Clasificación IgD/CD27)**



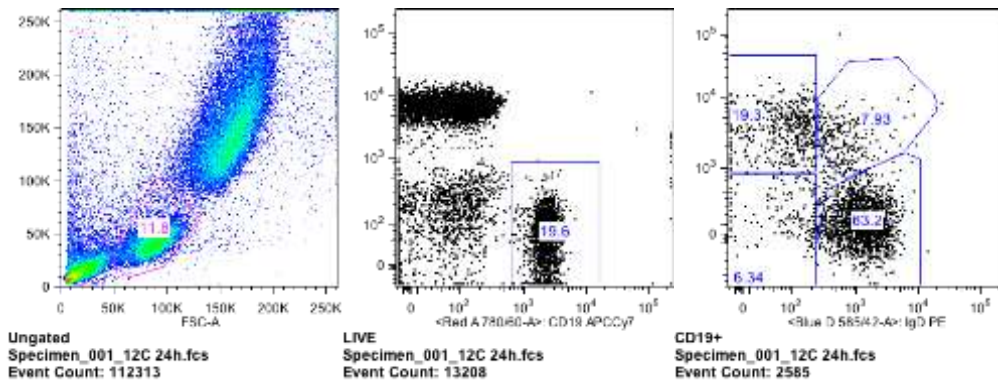
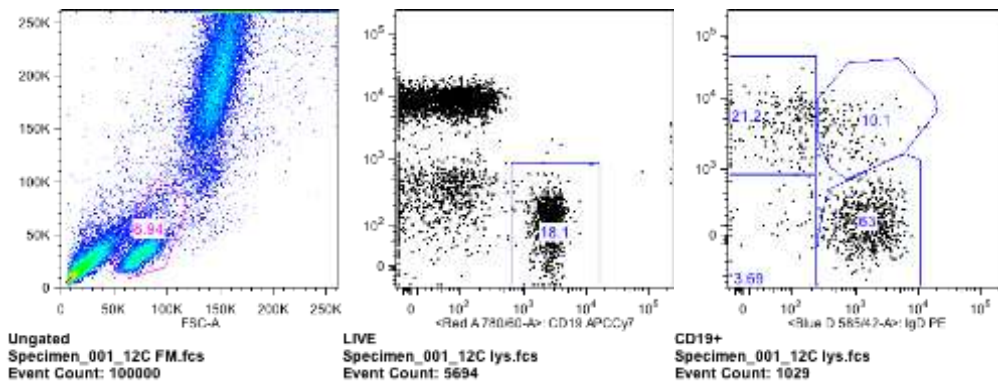
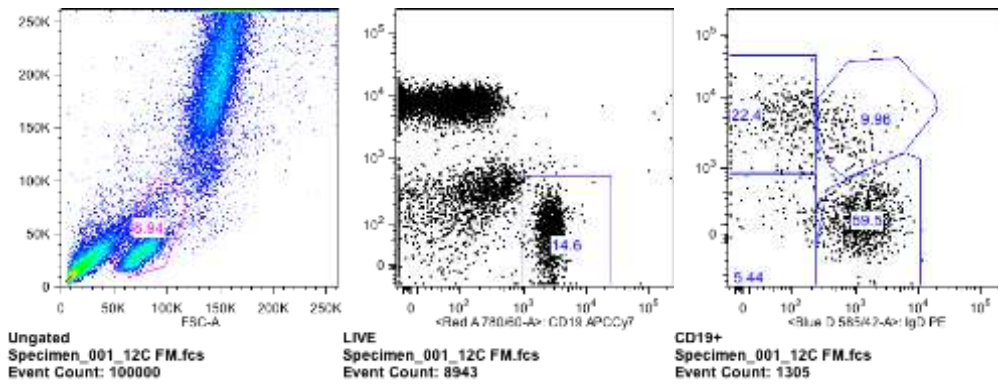
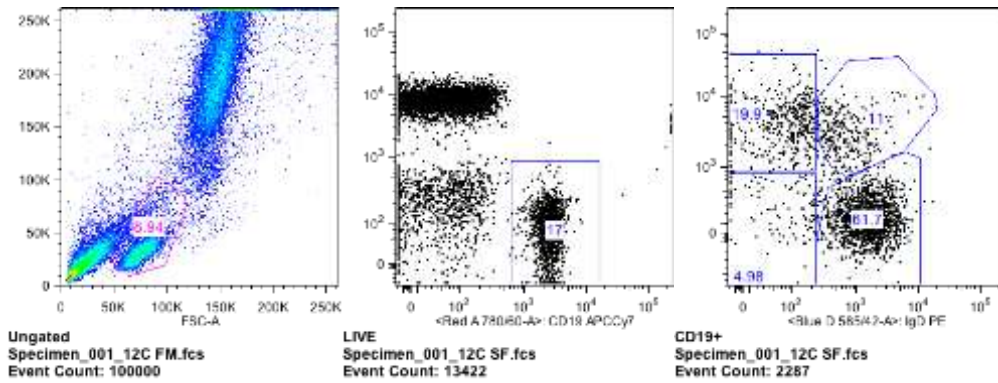
**SUJETO 10 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 11 (Clasificación IgD/CD27)**

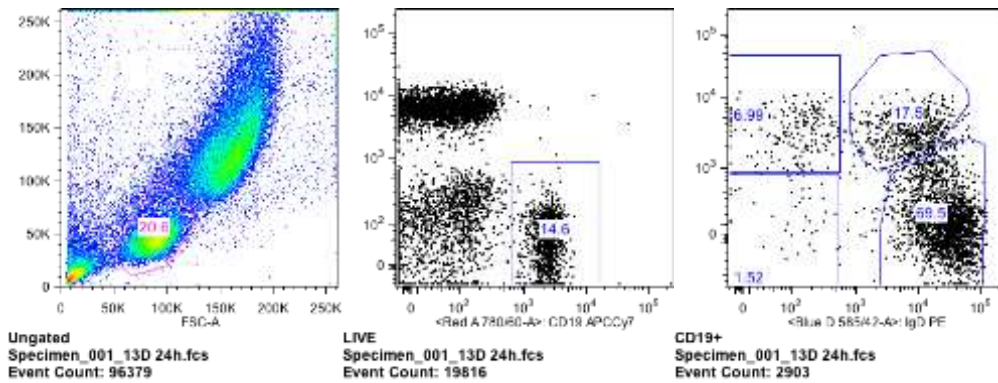
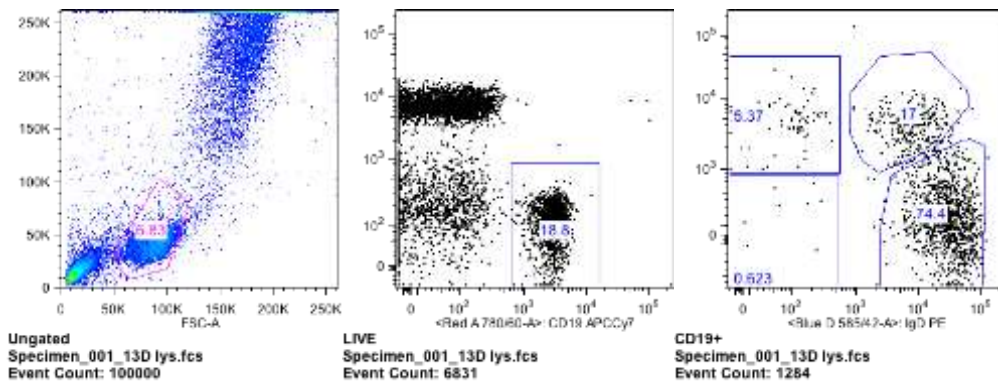
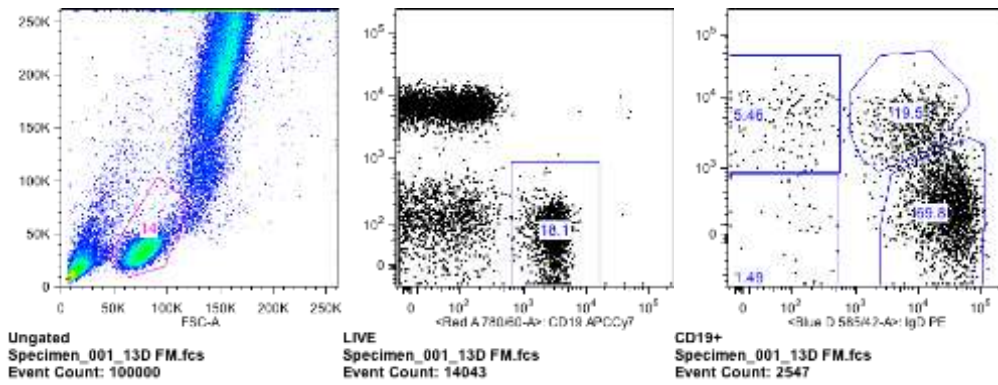
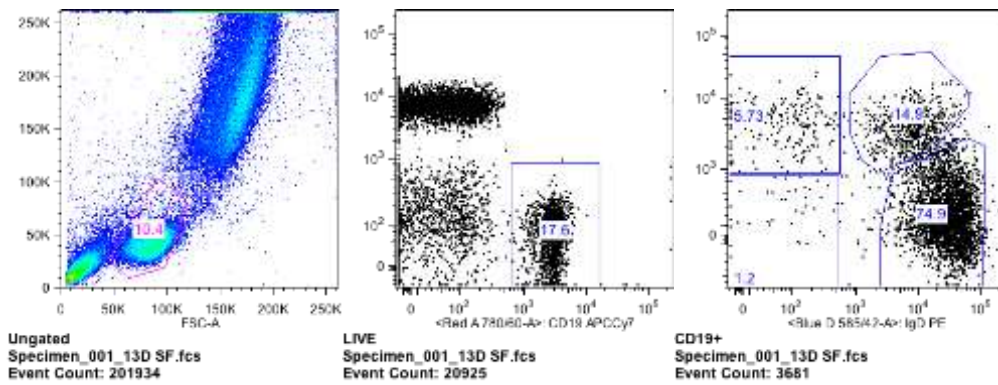


**SUJETO 12 (Clasificación IgD/CD27)**

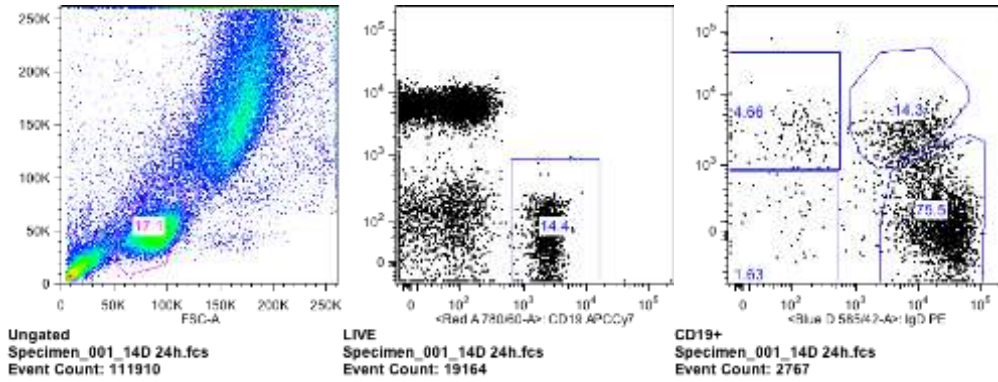
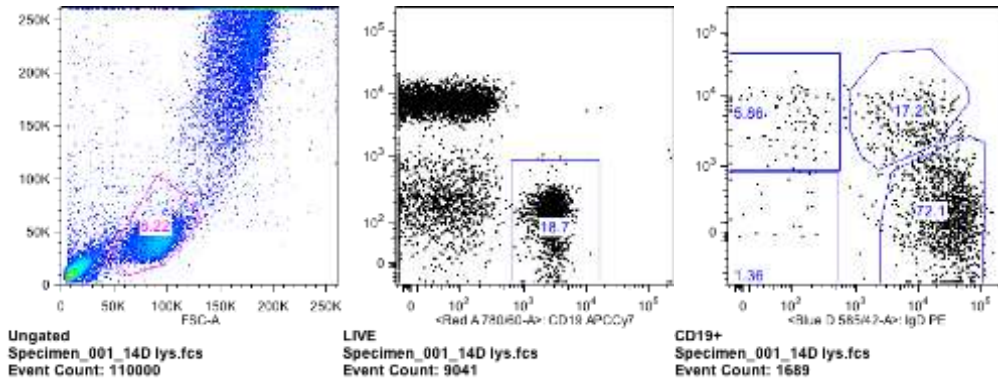
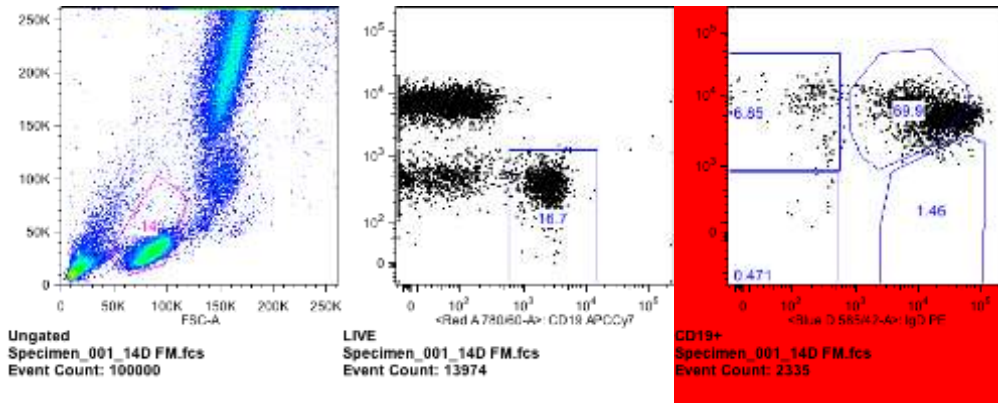
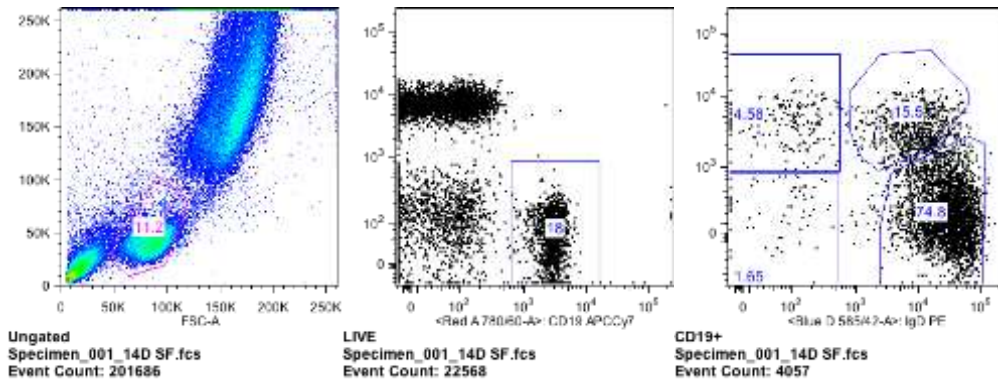




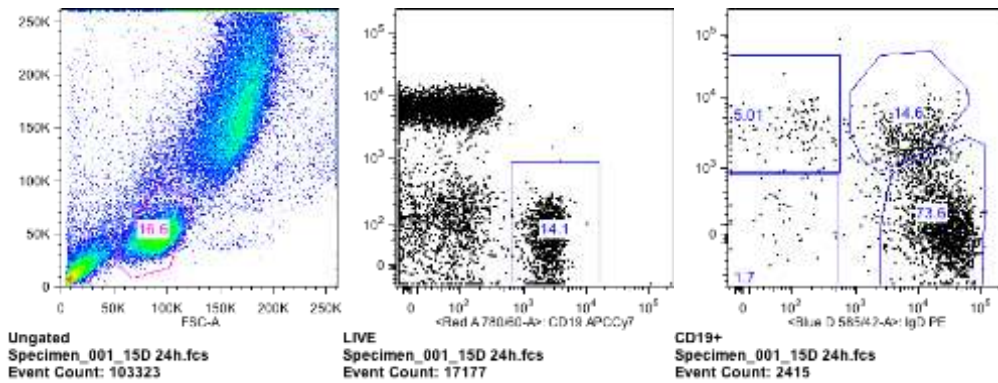
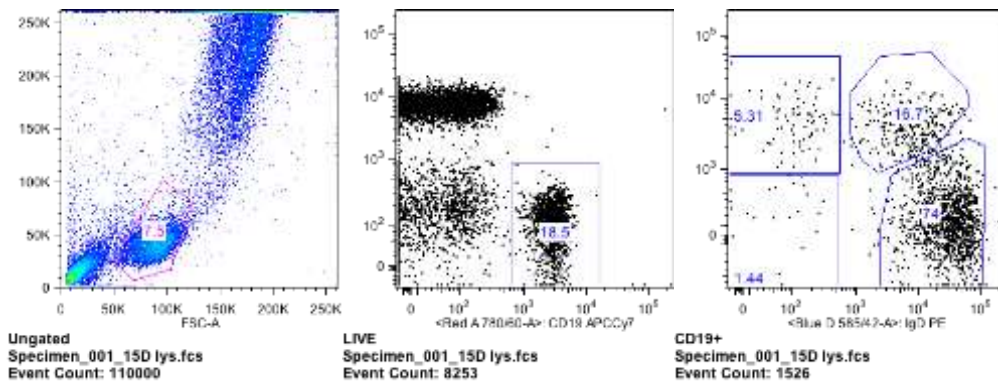
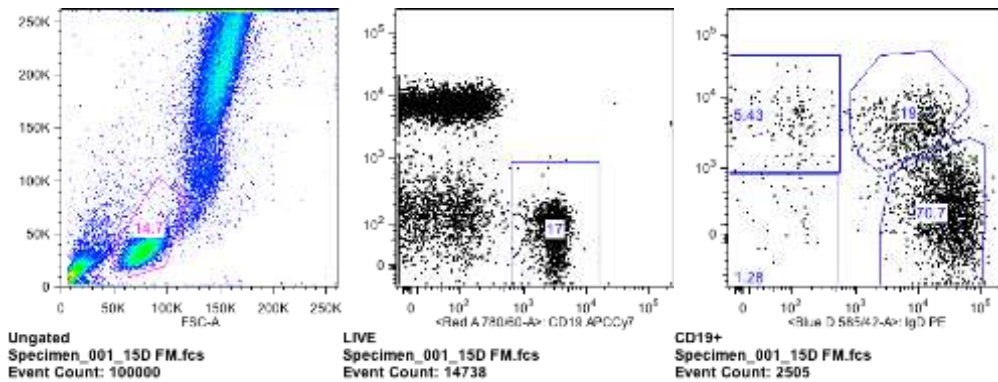
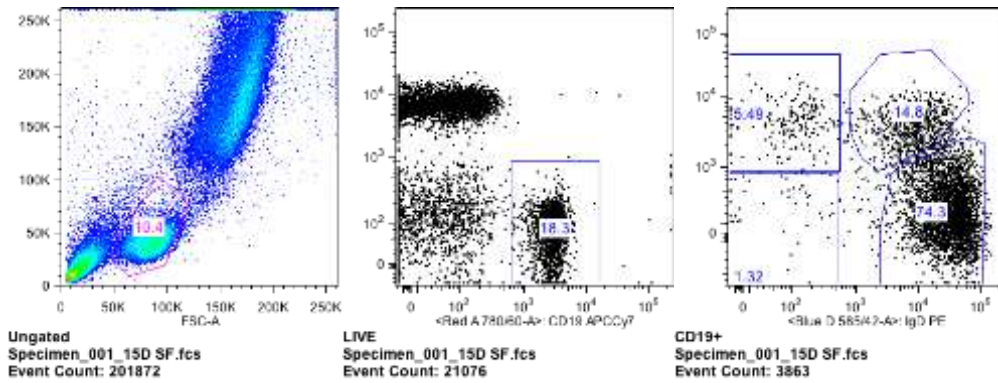
### SUJETO 13 (Clasificación IgD/CD27)



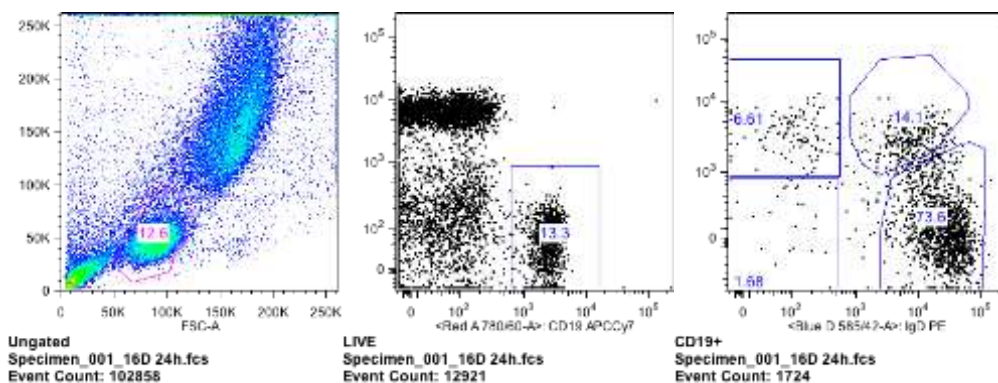
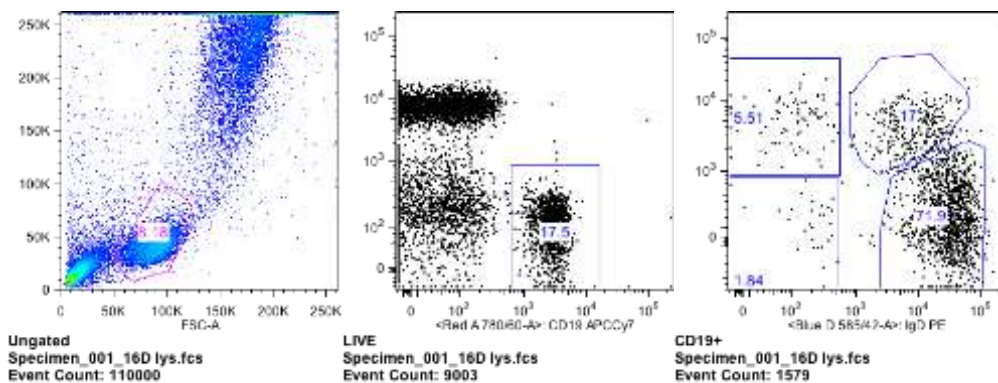
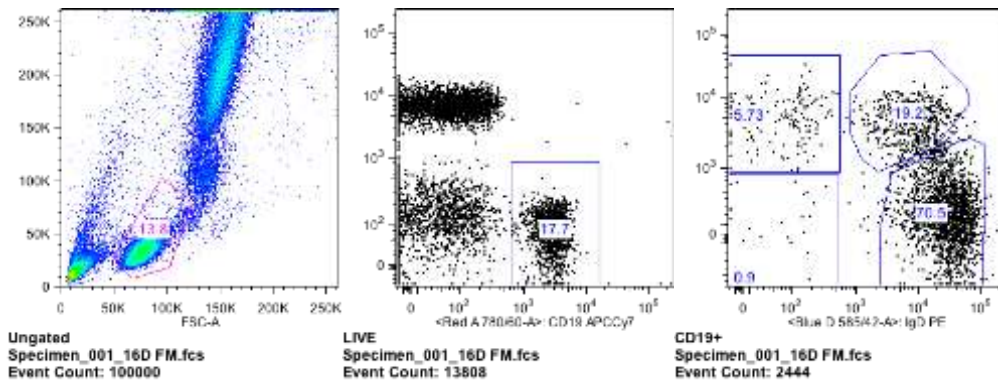
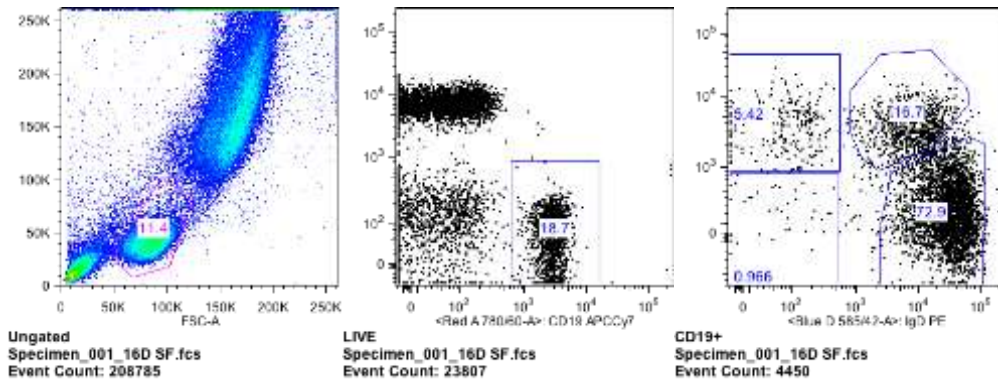
**SUJETO 14 (Clasificación IgD/CD27)**



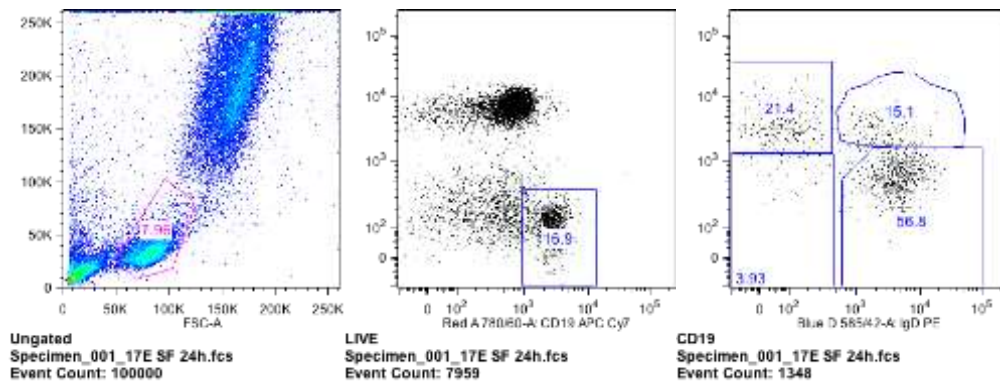
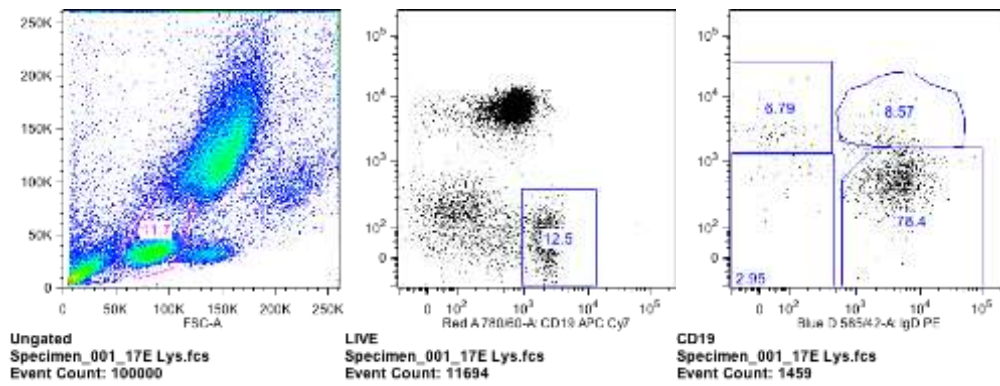
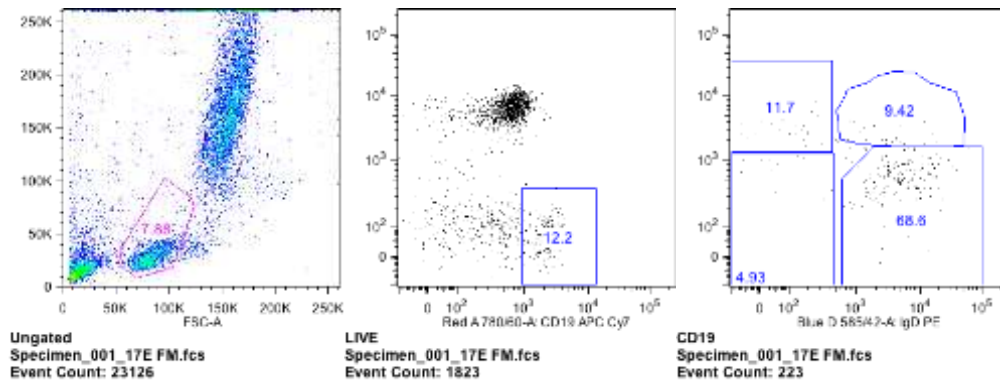
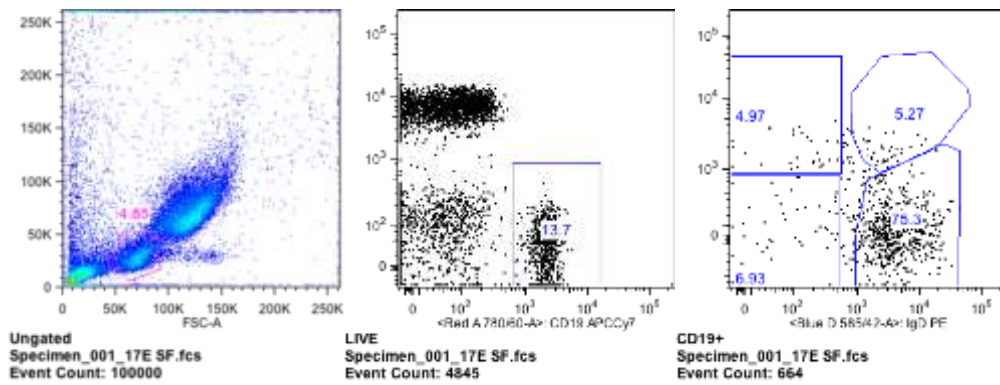
**SUJETO 15 (Clasificación IgD/CD27)**



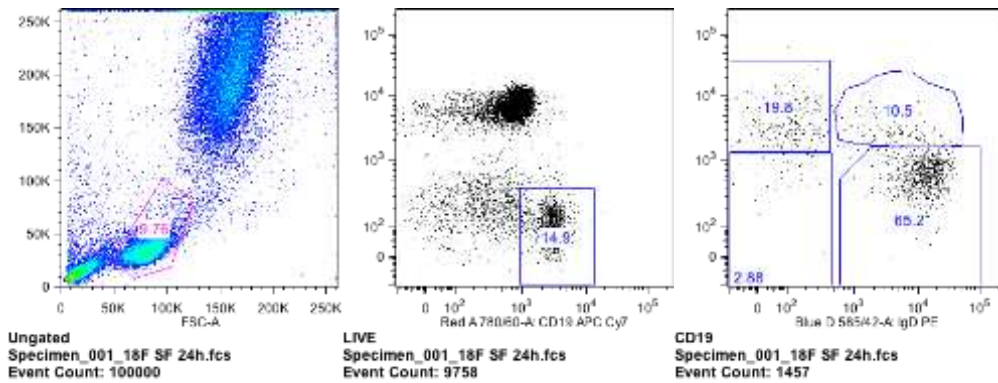
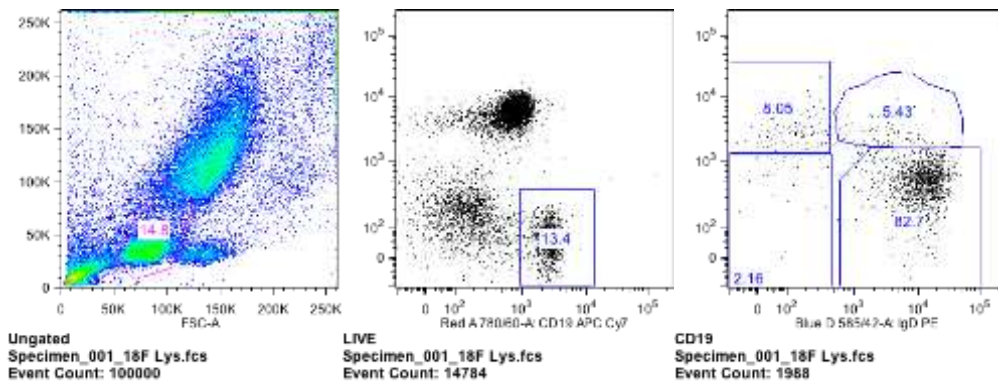
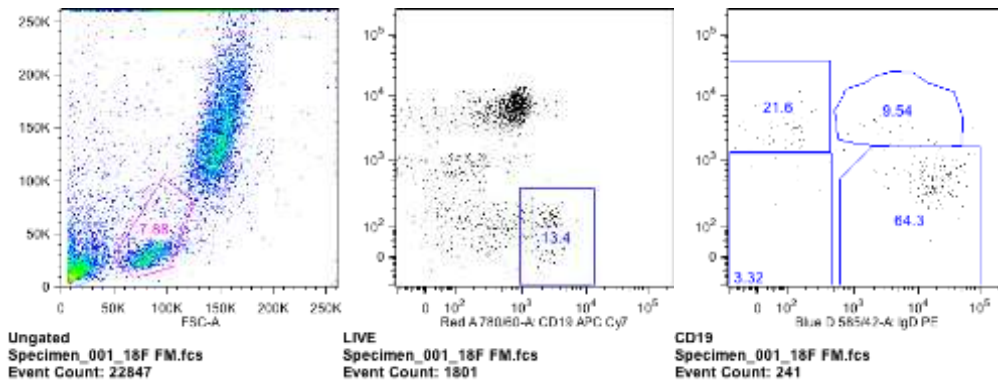
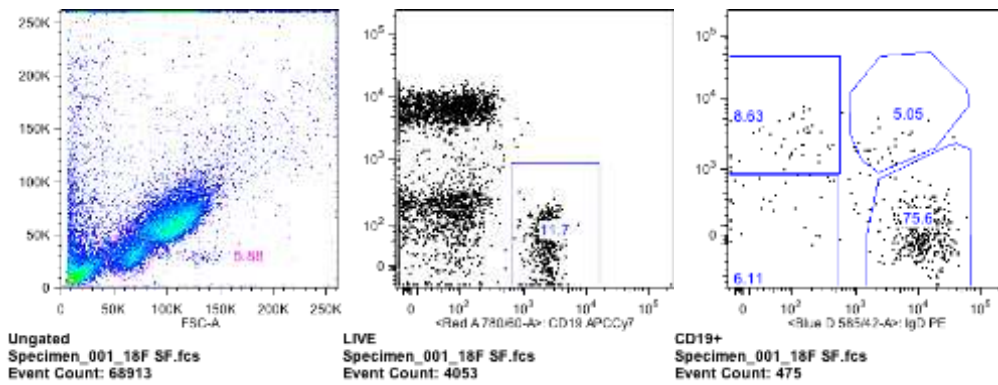
**SUJETO 16 (Clasificación IgD/CD27)**



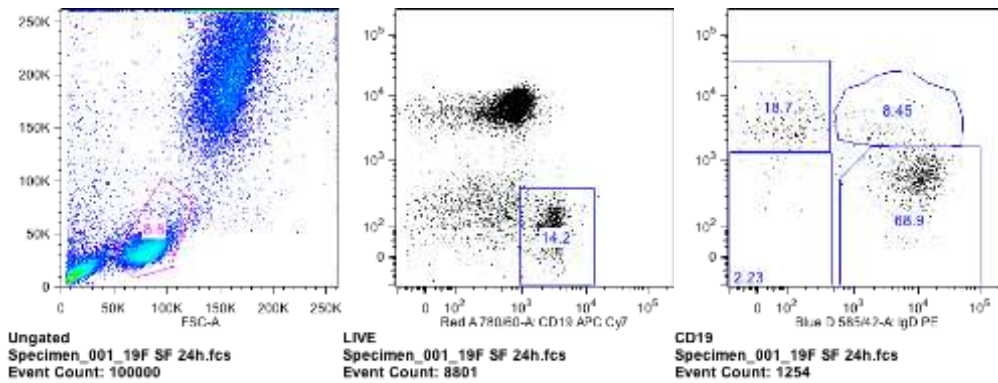
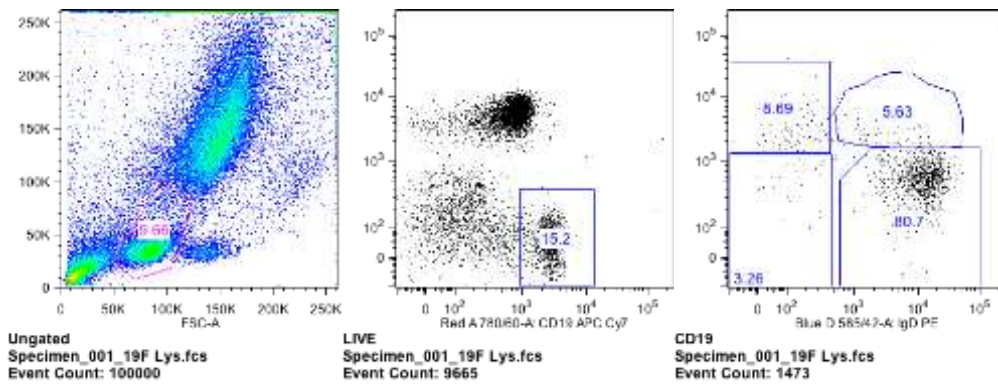
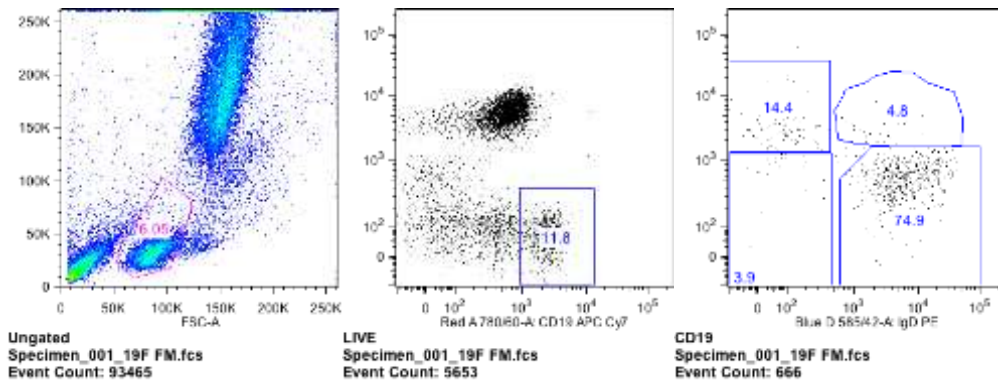
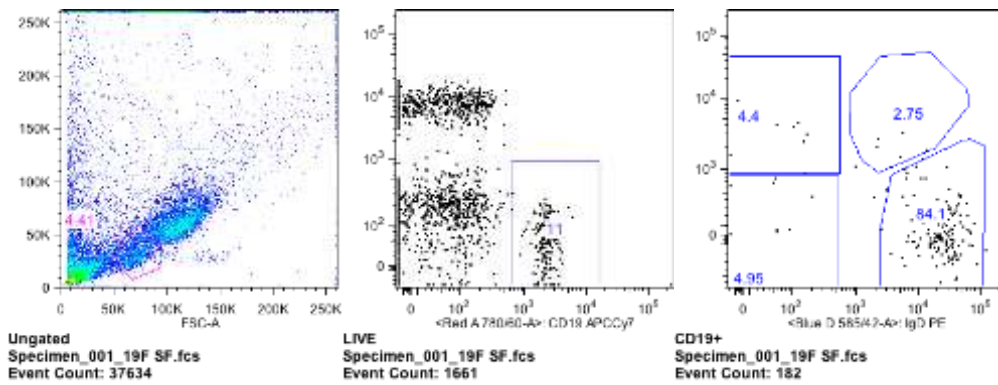
**SUJETO 17 (Clasificación IgD/CD27)**



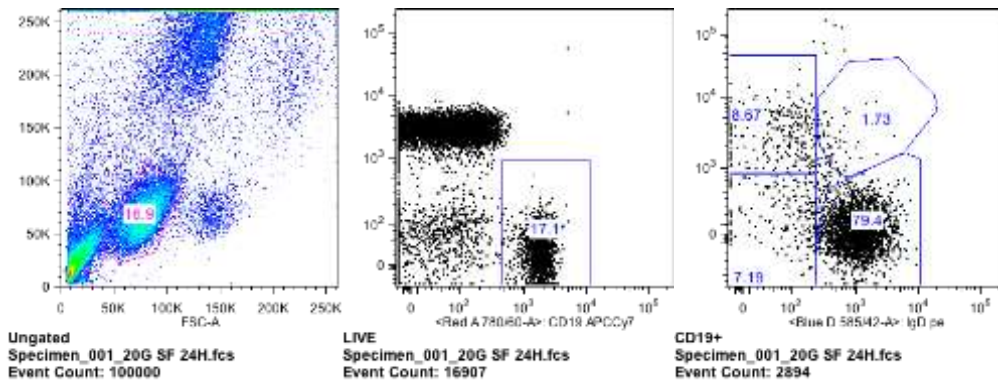
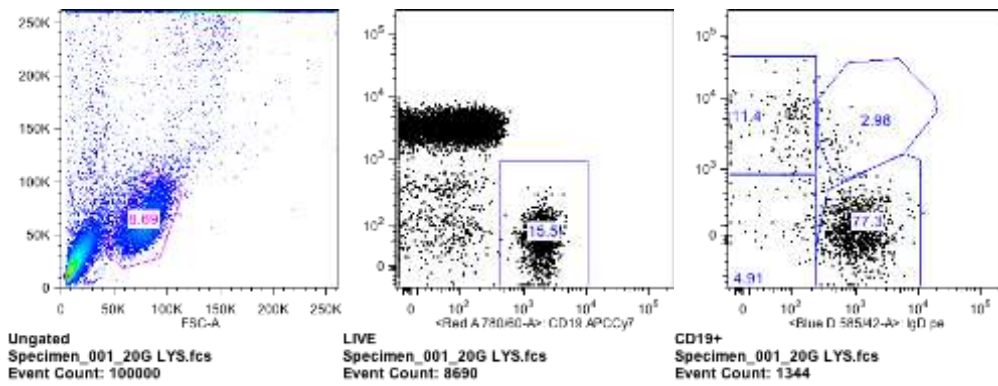
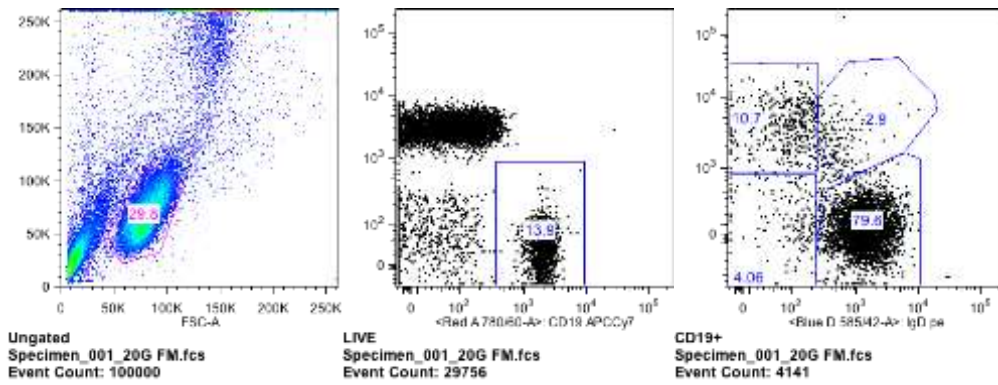
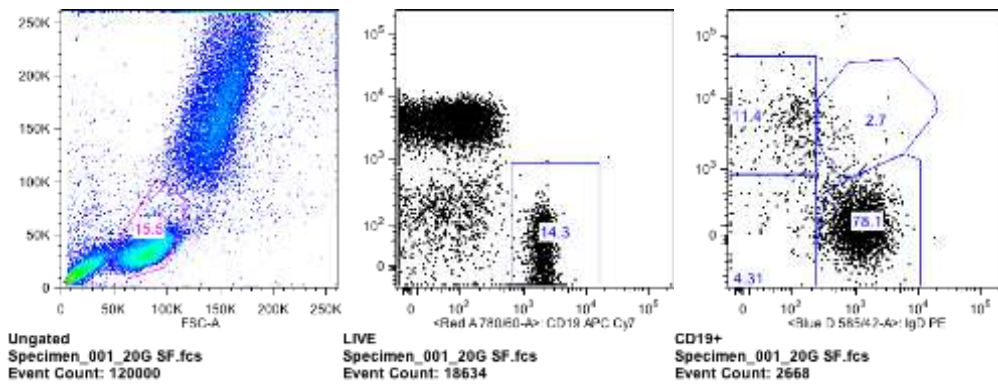
**SUJETO 18 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 19 (Clasificación IgD/CD27)**

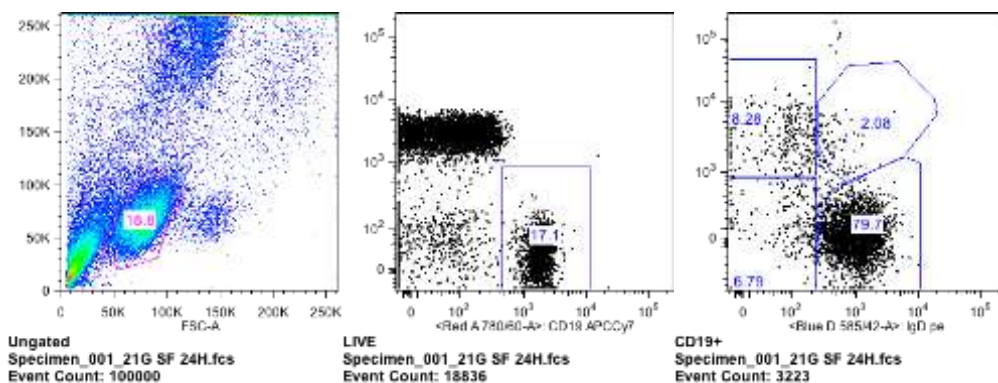
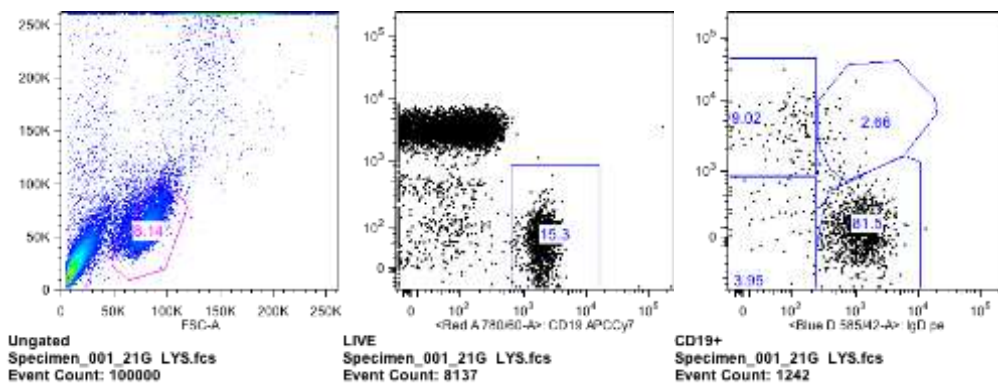
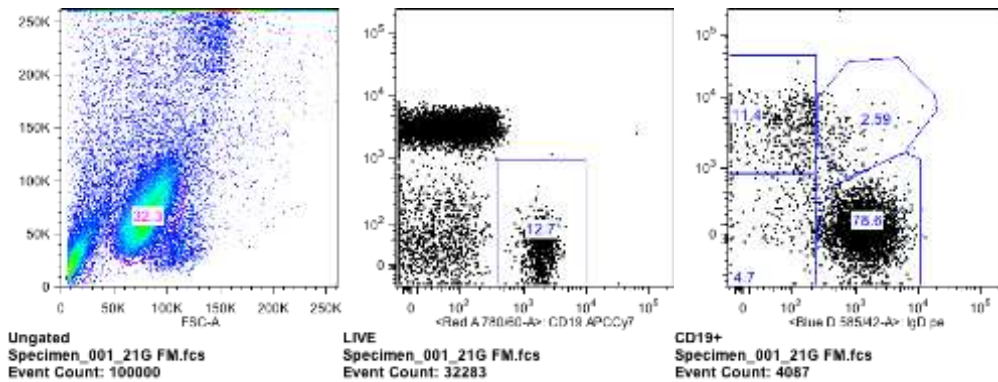
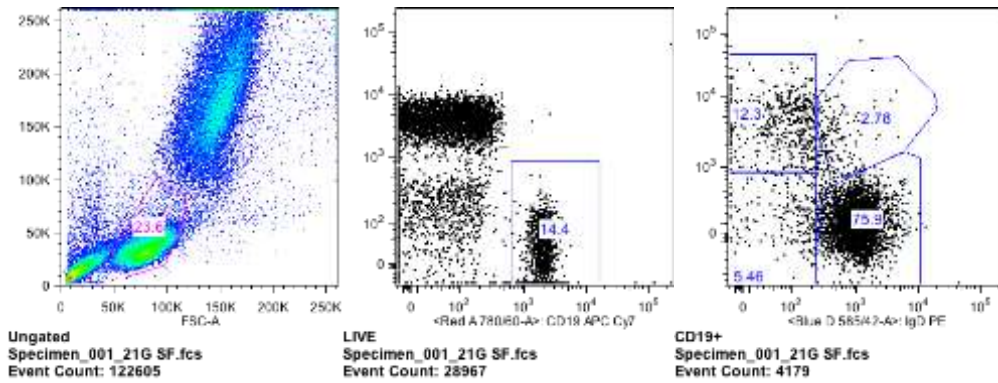


**SUJETO 20 (Clasificación IgD/CD27)**

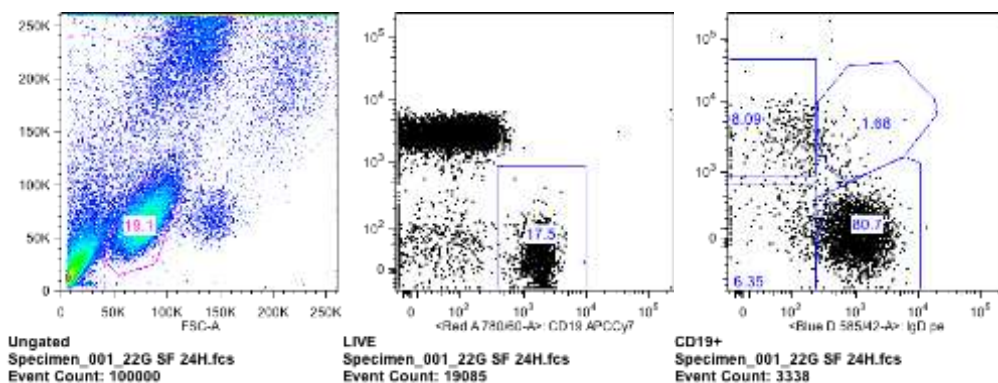
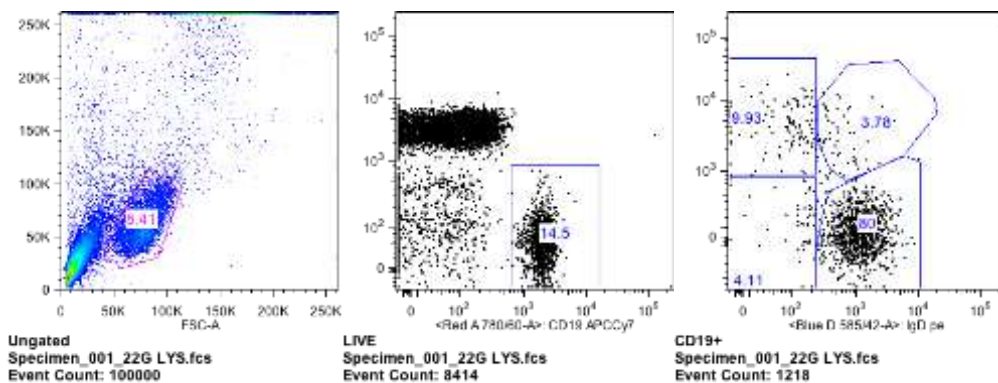
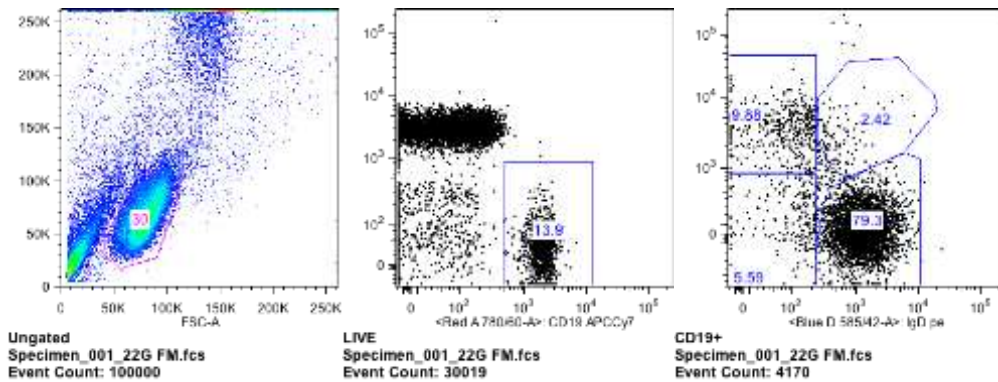
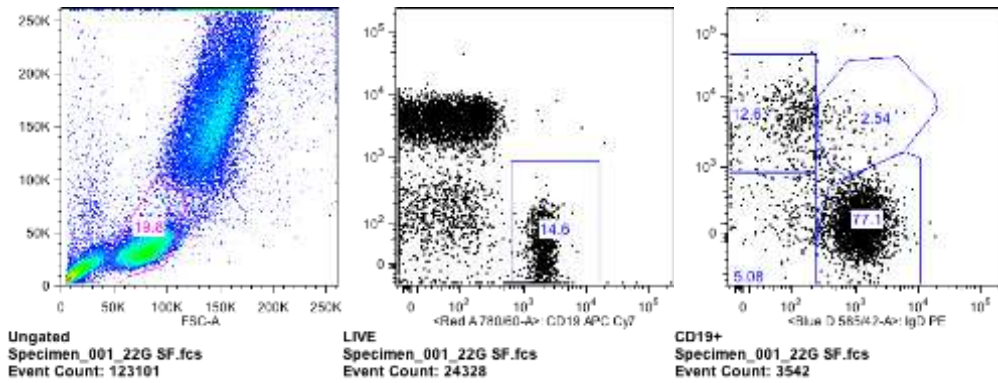




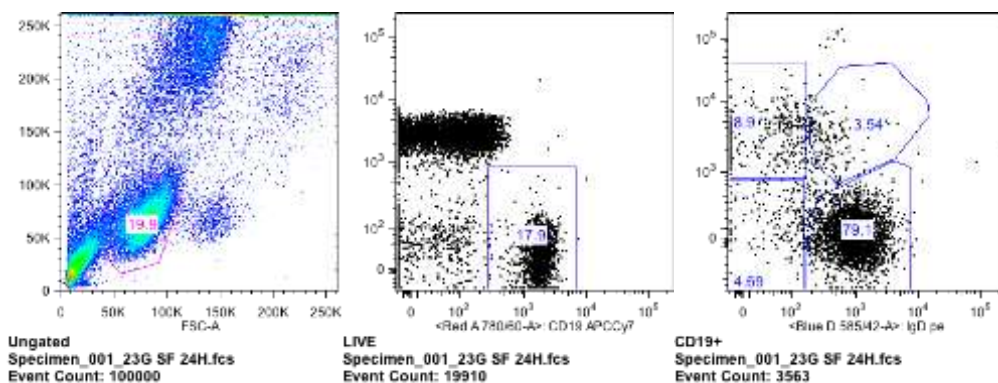
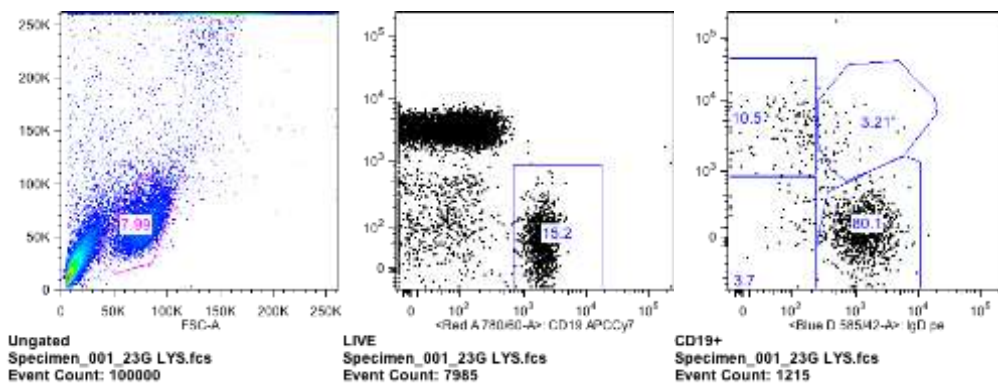
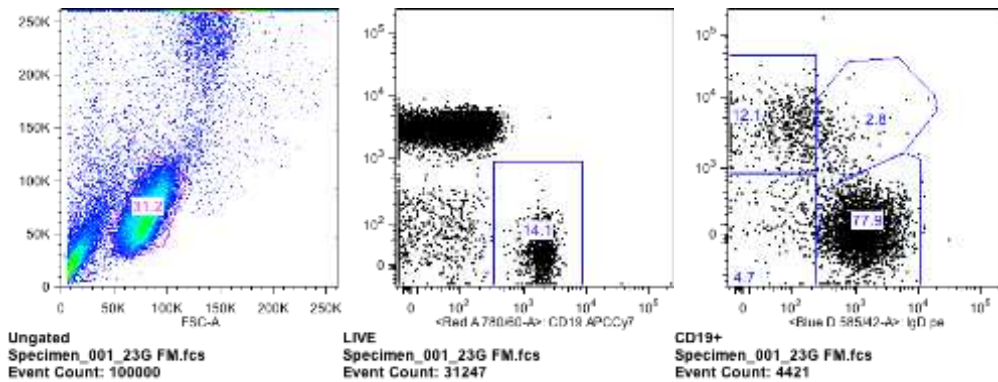
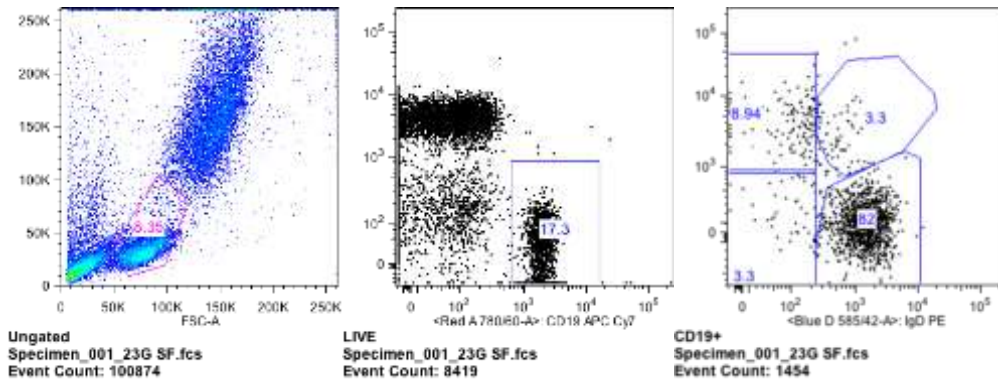
**SUJETO 21 (Clasificación IgD/CD27)**



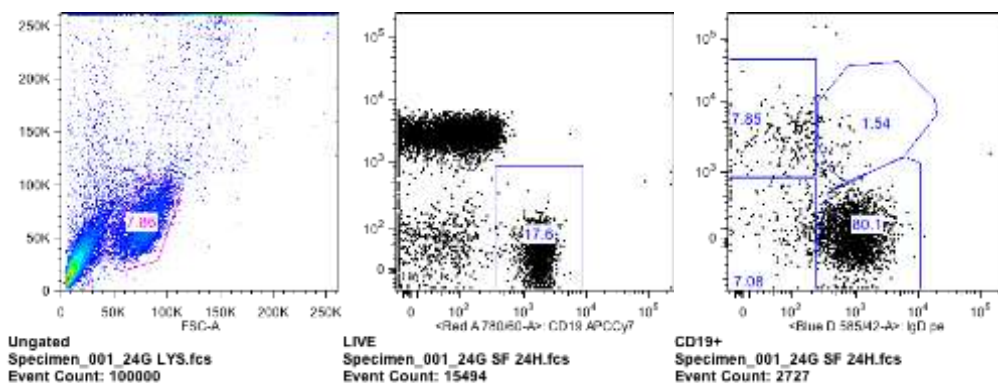
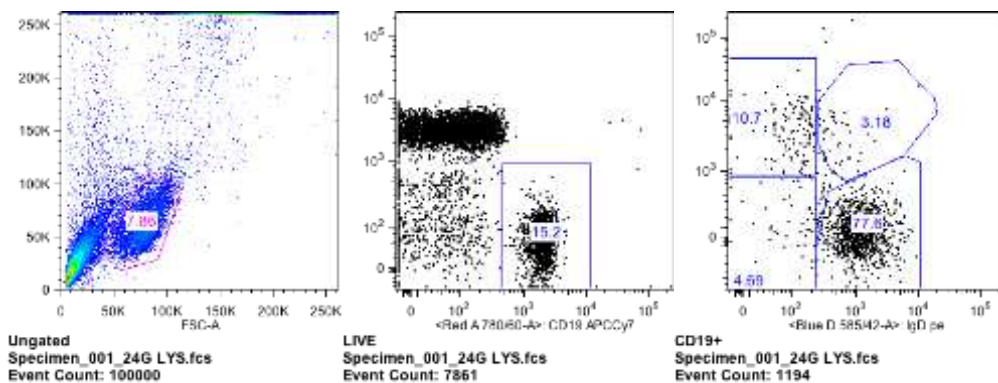
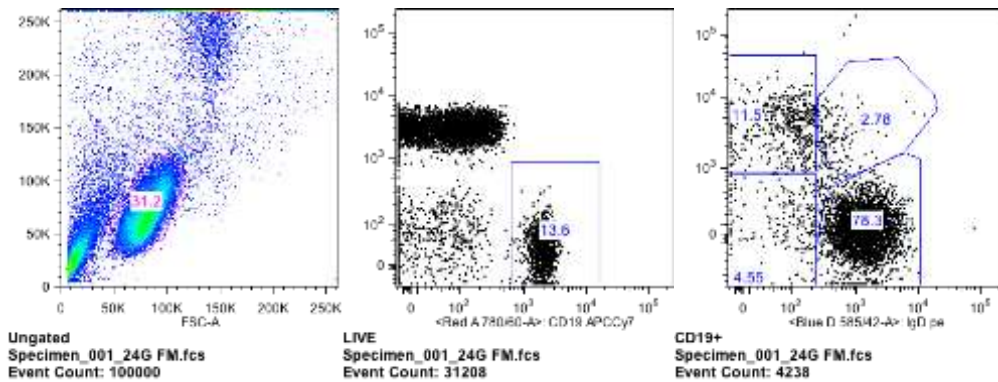
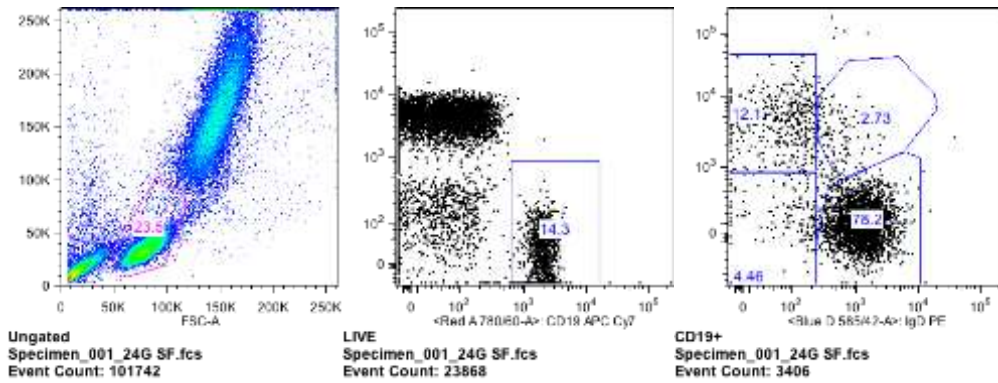
**SUJETO 22 (Clasificación IgD/CD27)**



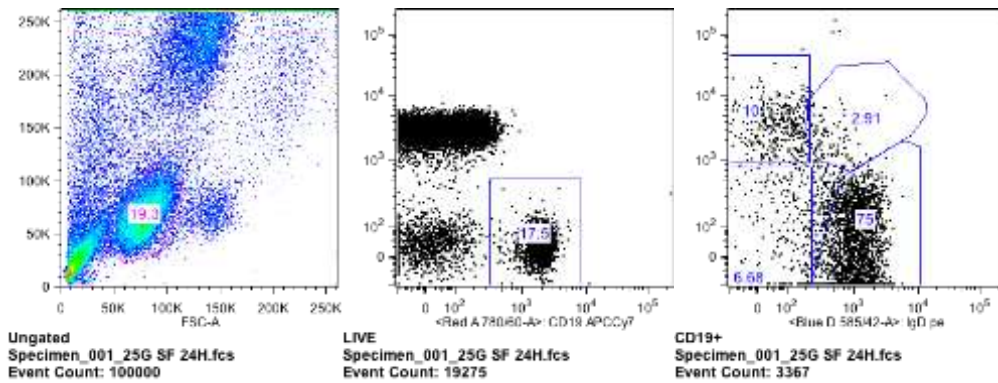
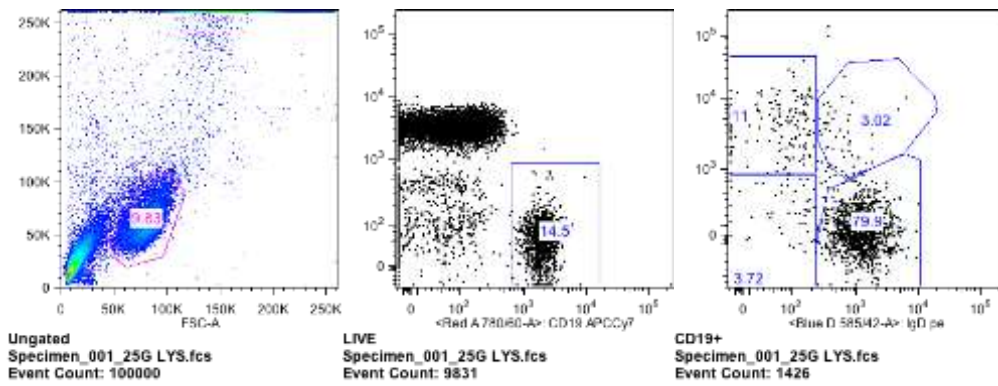
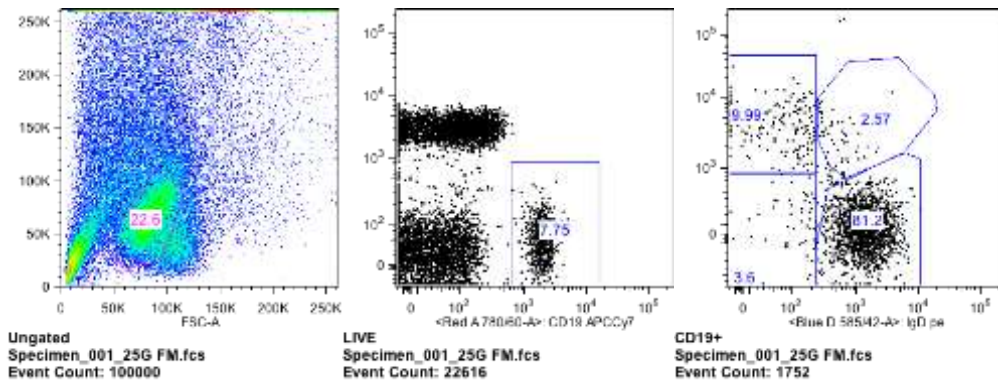
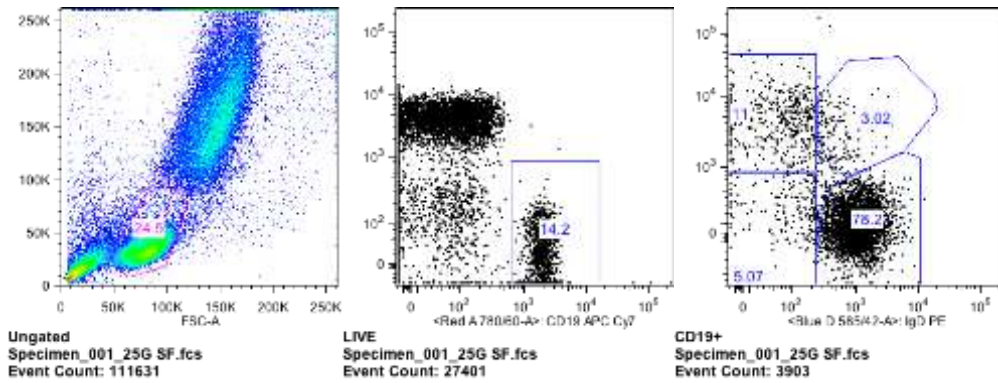
**SUJETO 23 (Clasificación IgD/CD27)**



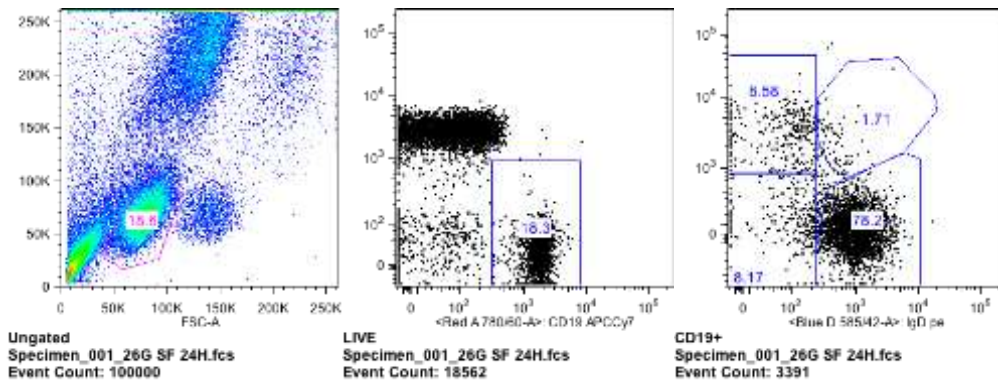
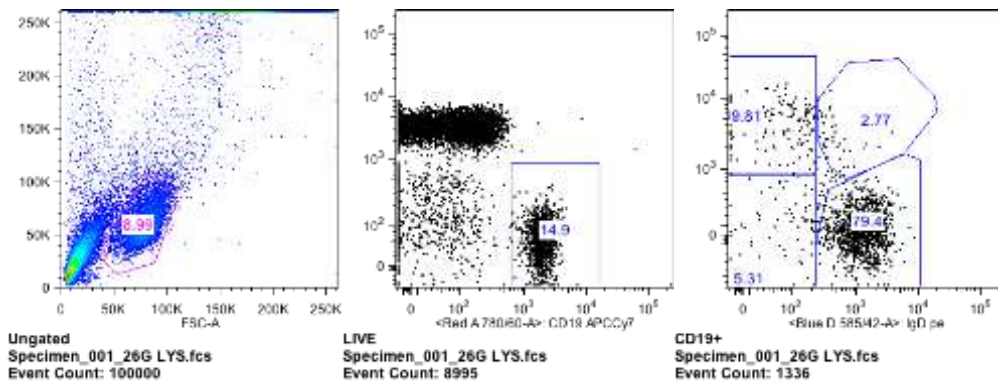
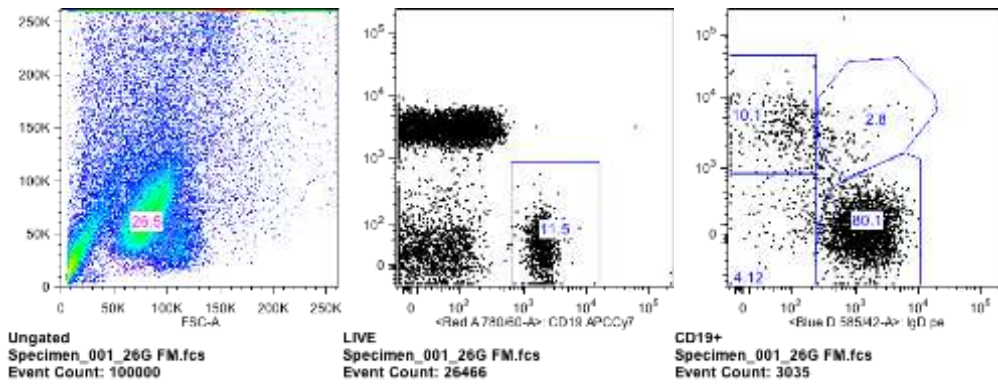
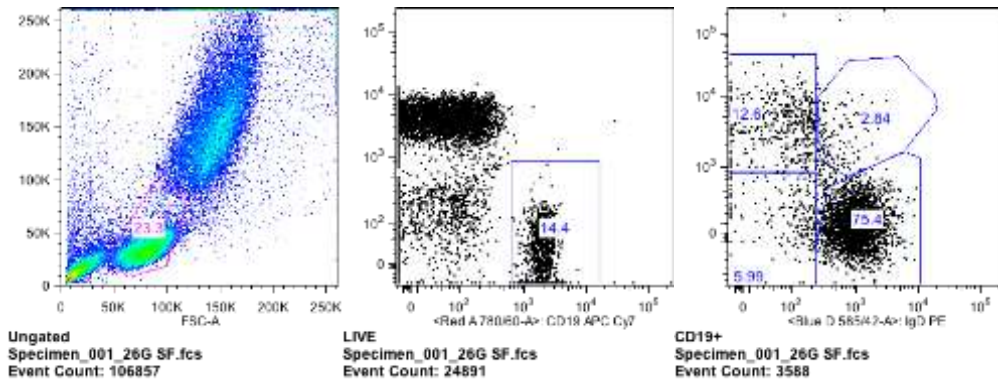
**SUJETO 24 (Clasificación IgD/CD27)**



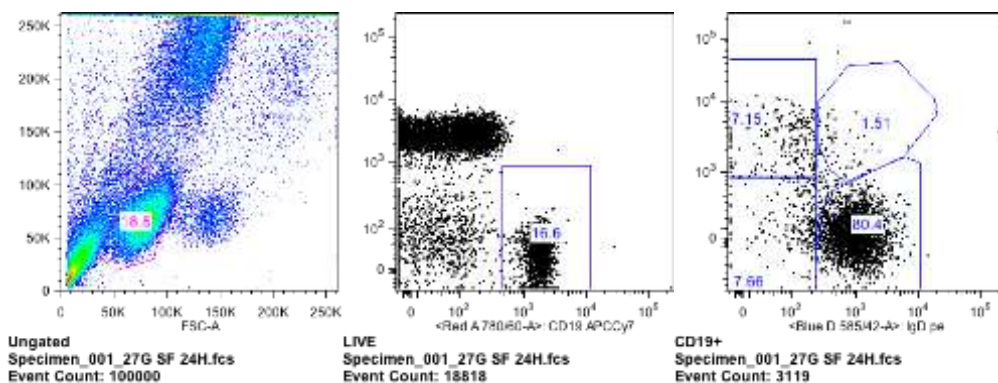
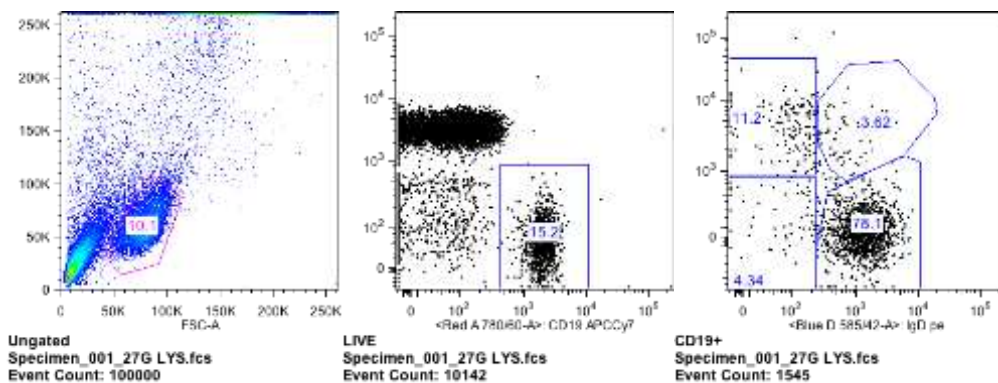
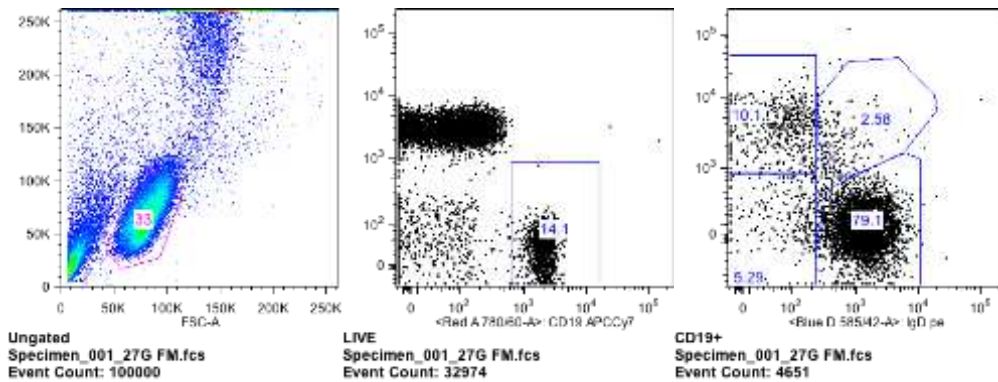
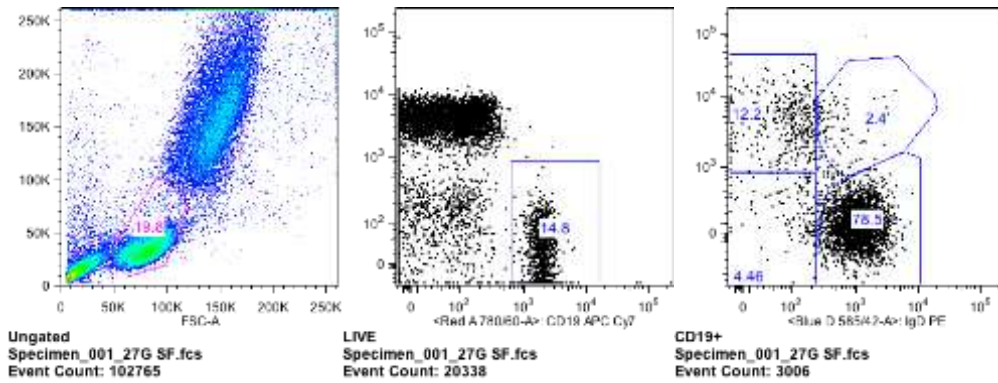
**SUJETO 25 (Clasificación IgD/CD27)**



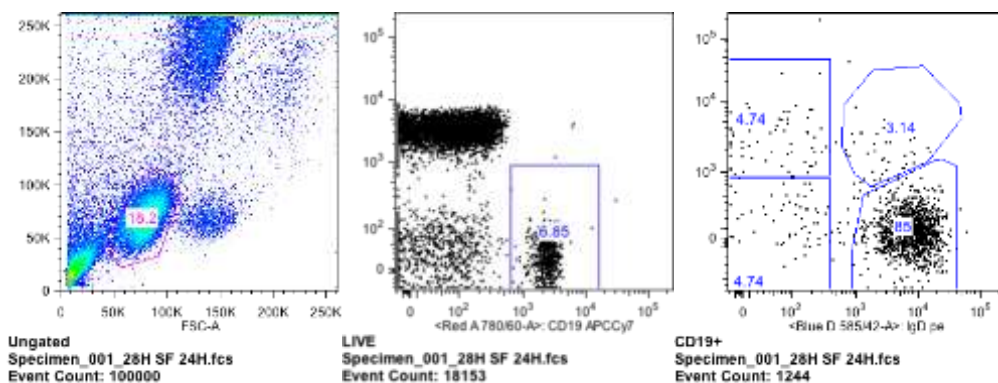
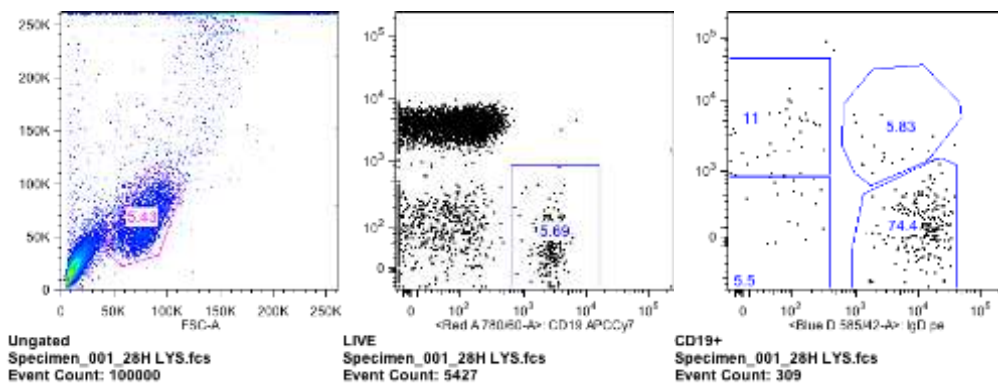
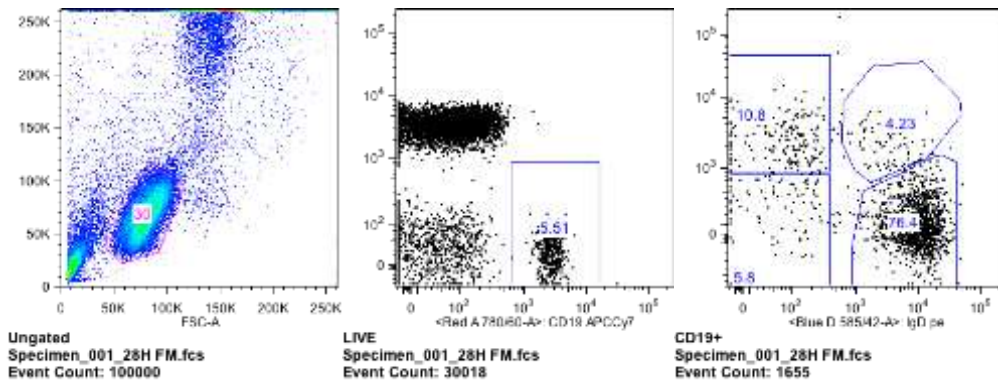
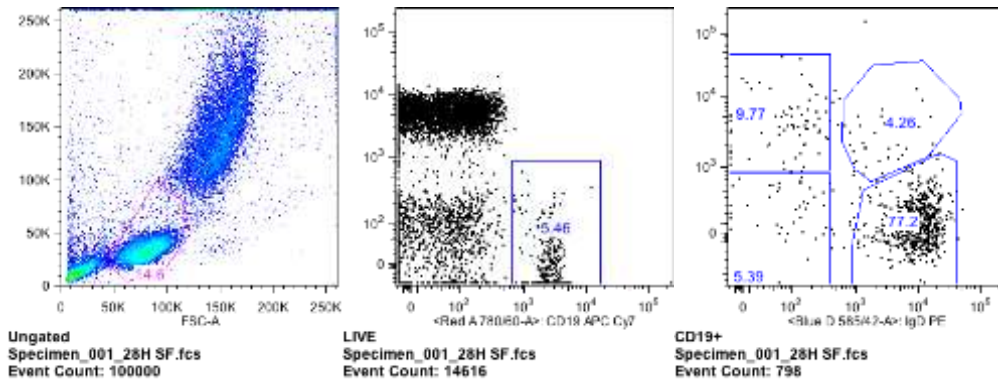
**SUJETO 26 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 27 (Clasificación IgD/CD27)**

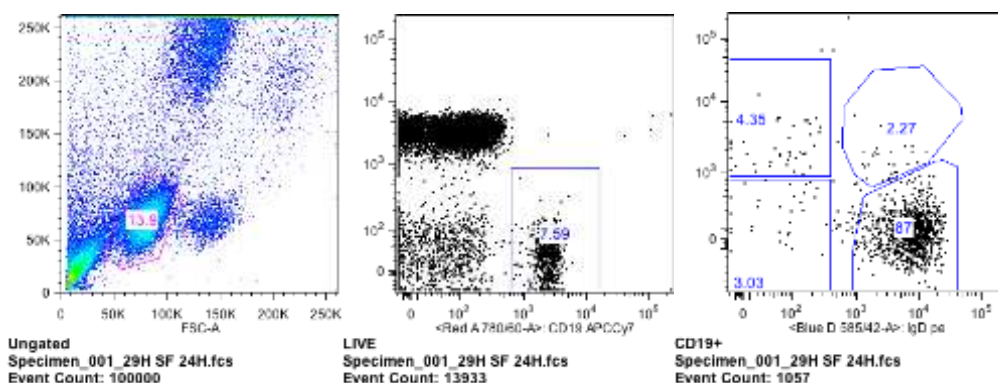
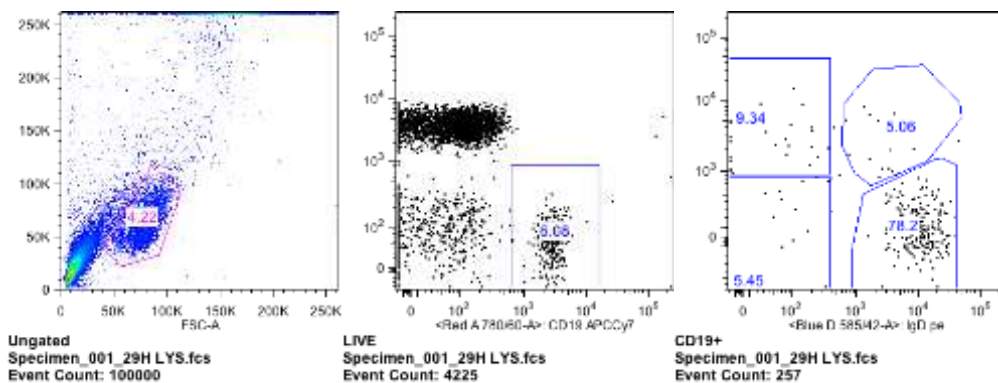
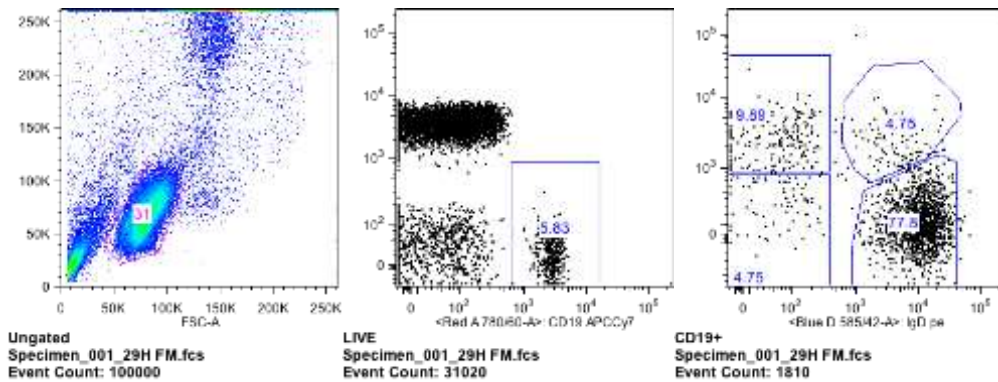
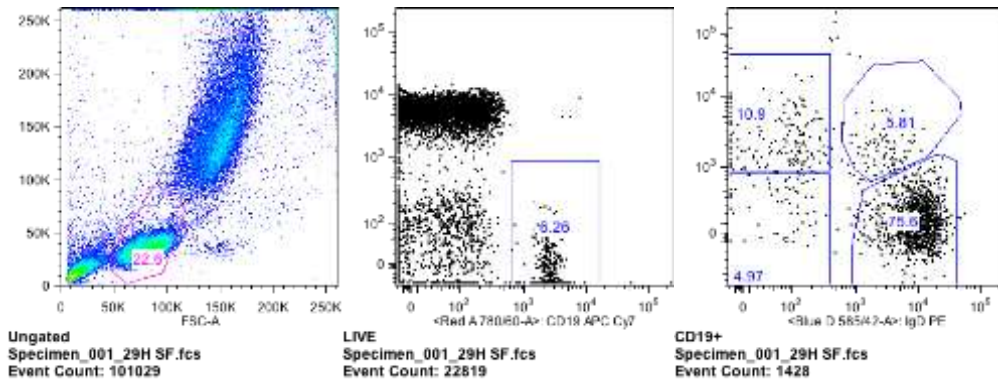


**SUJETO 28 (Clasificación IgD/CD27)**

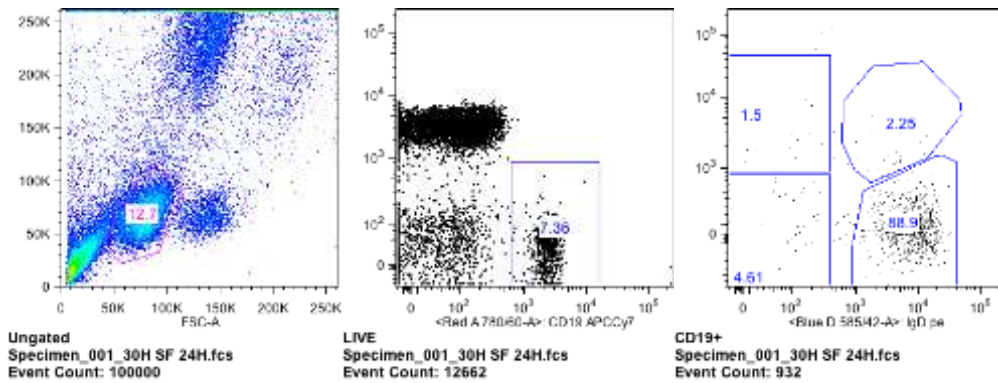
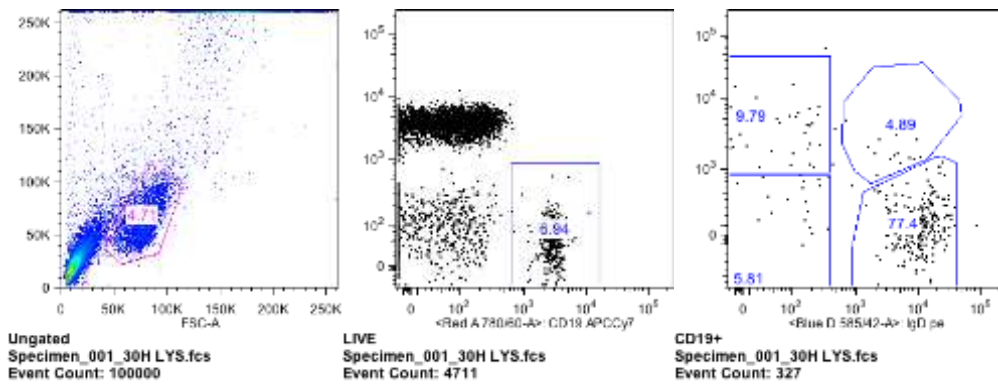
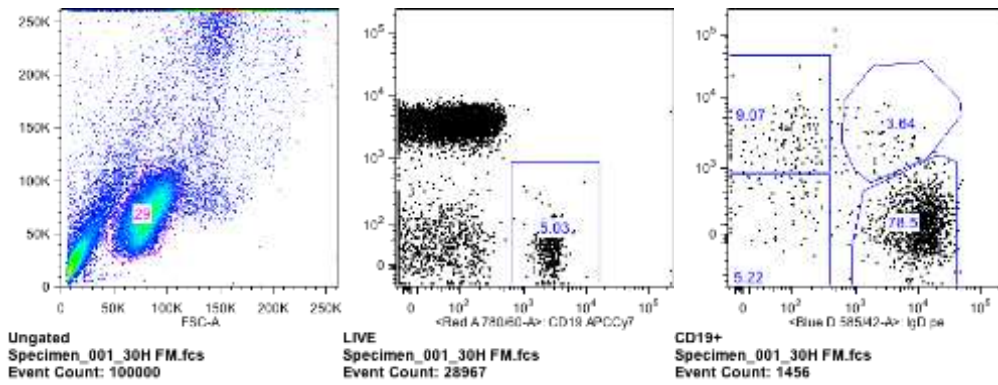
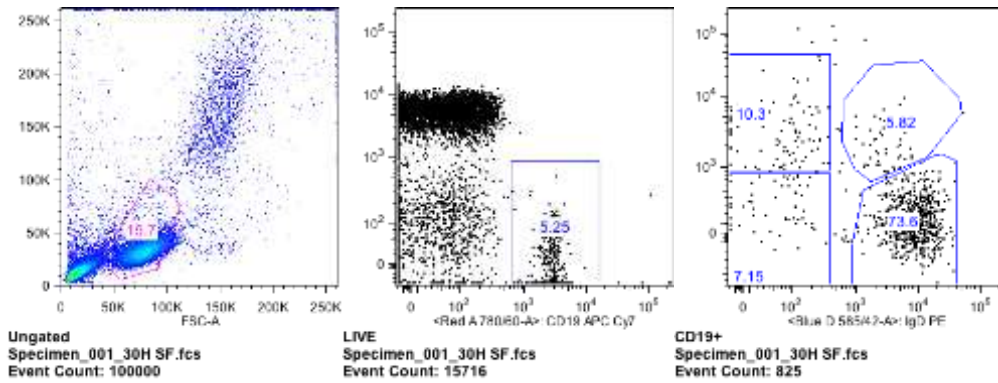




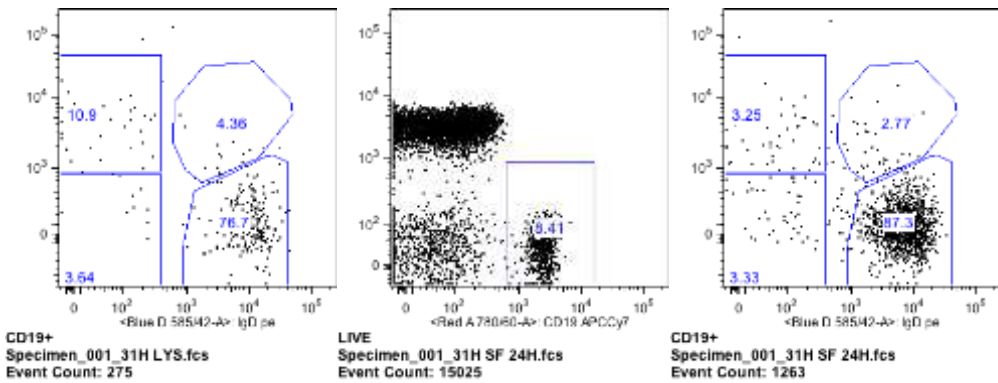
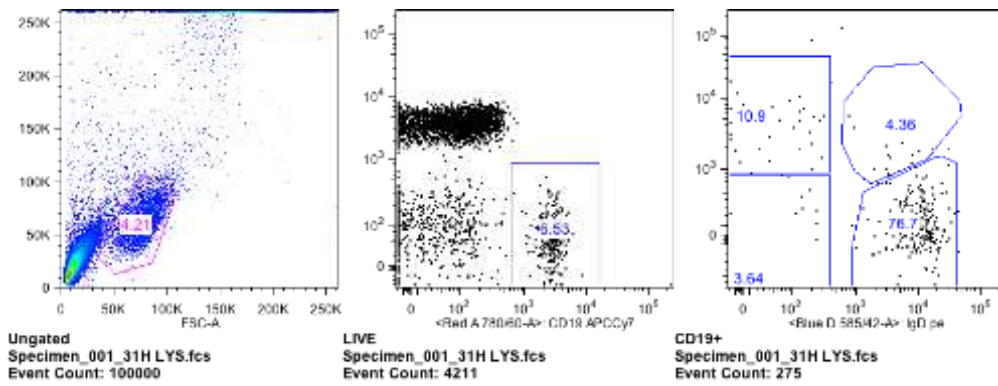
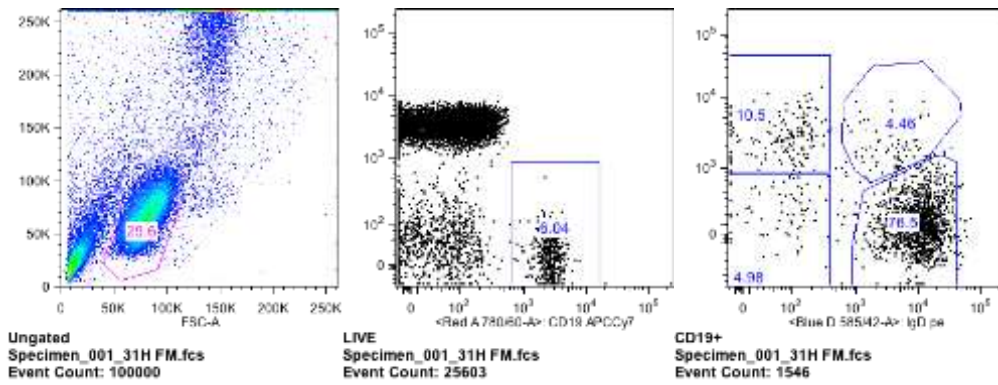
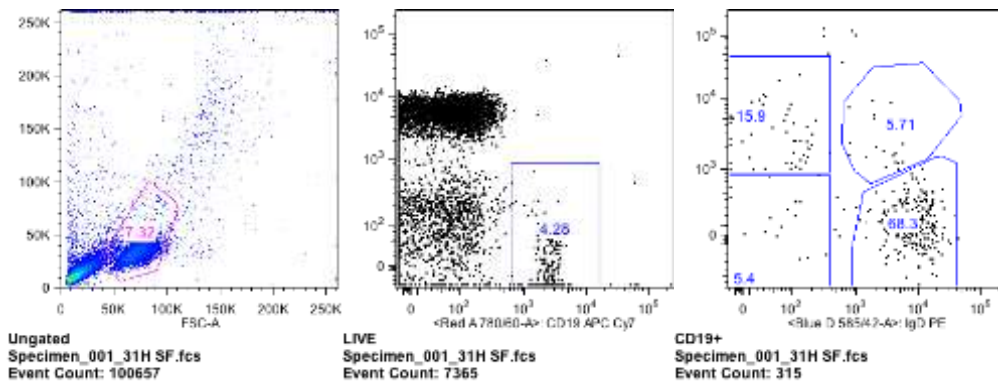
**SUJETO 29 (Clasificación IgD/CD27)**



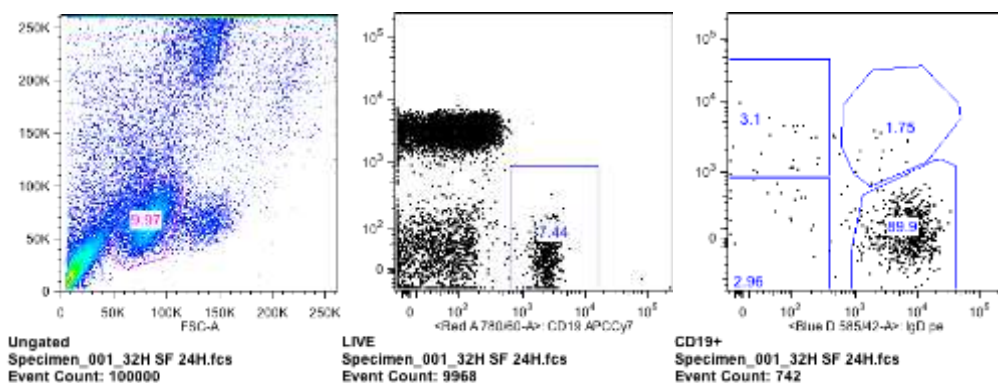
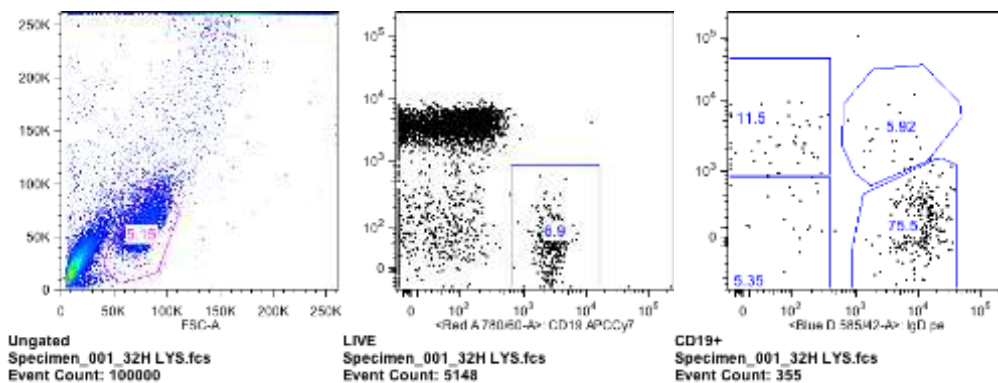
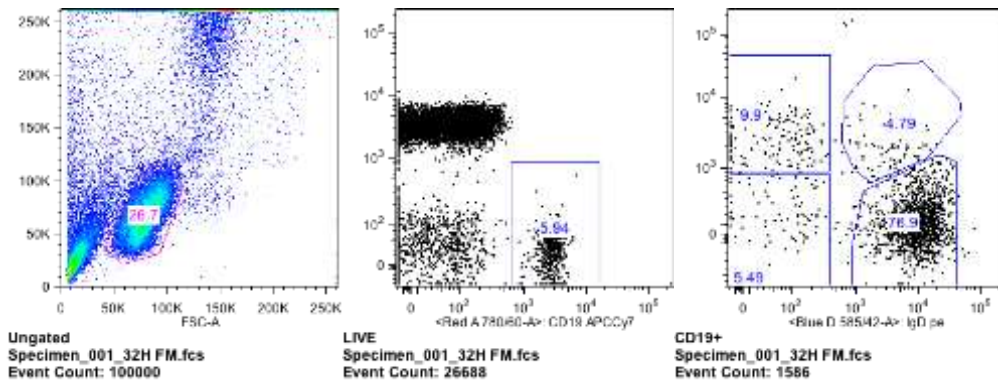
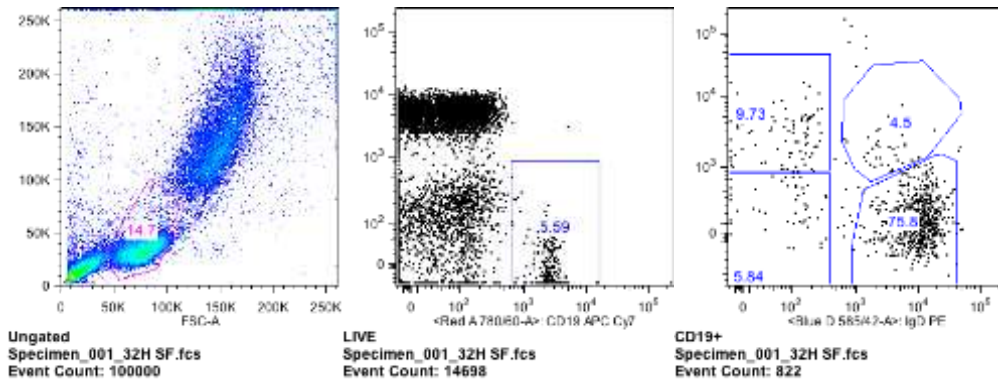
**SUJETO 30 (Clasificación IgD/CD27)**



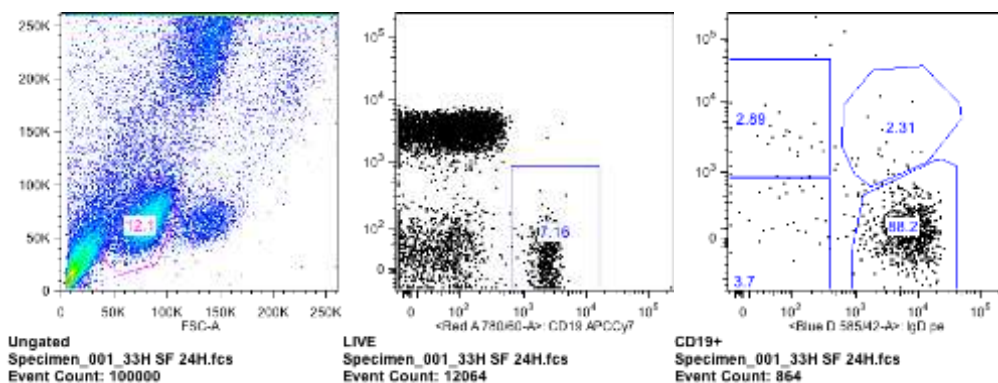
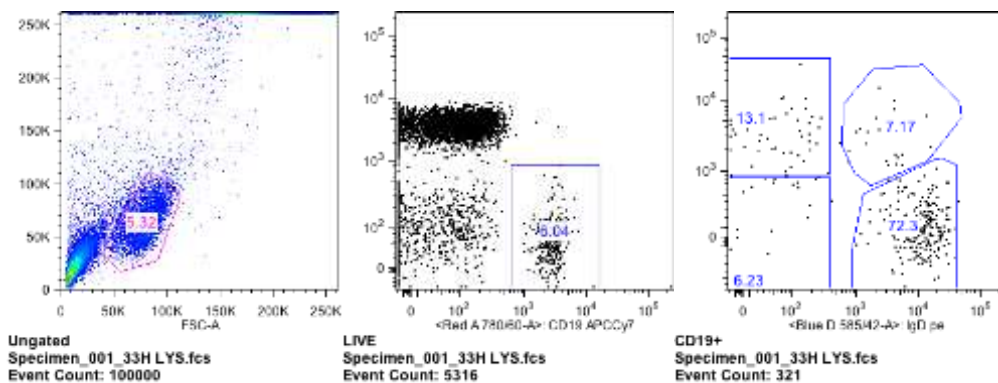
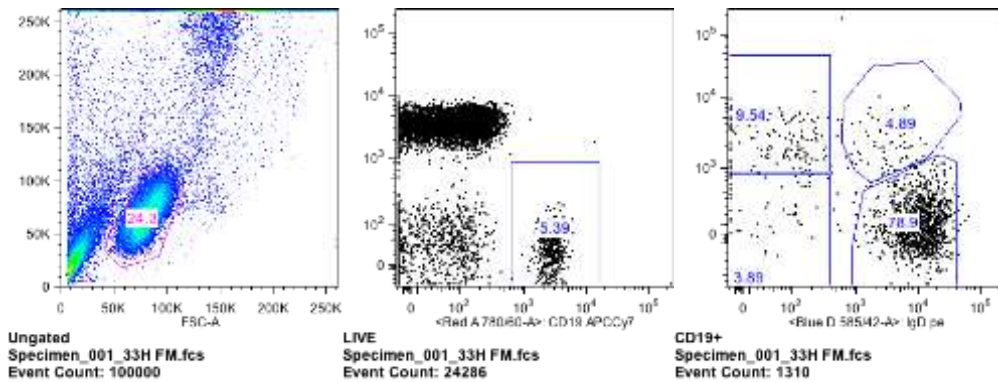
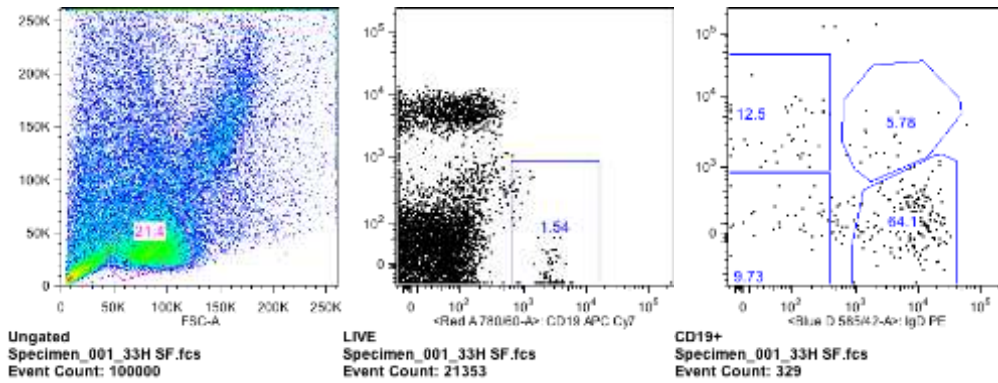
**SUJETO 31 (Clasificación IgD/CD27)**



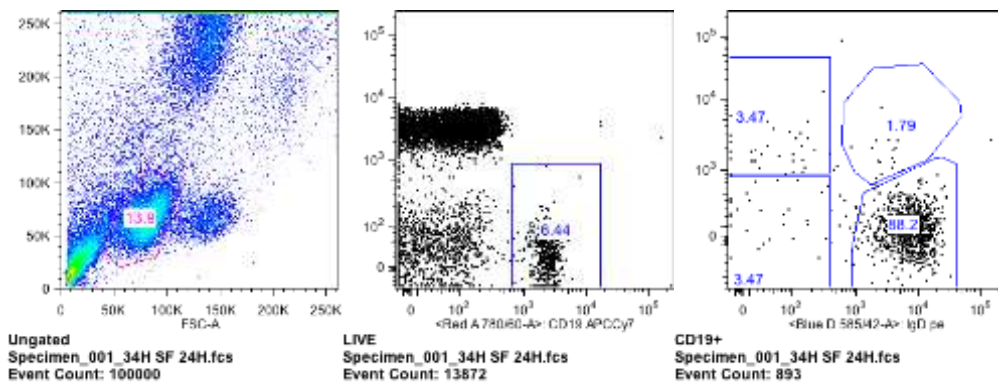
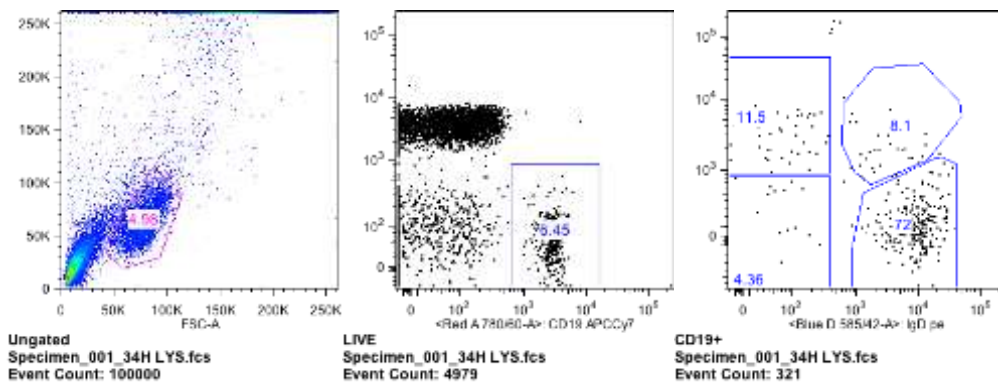
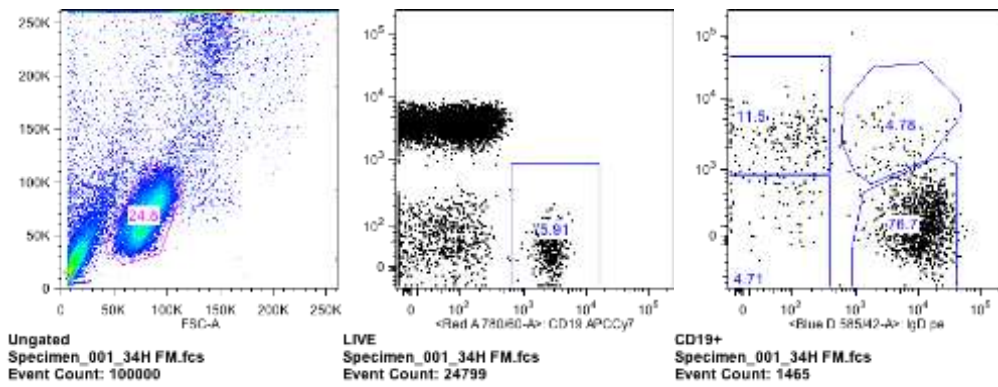
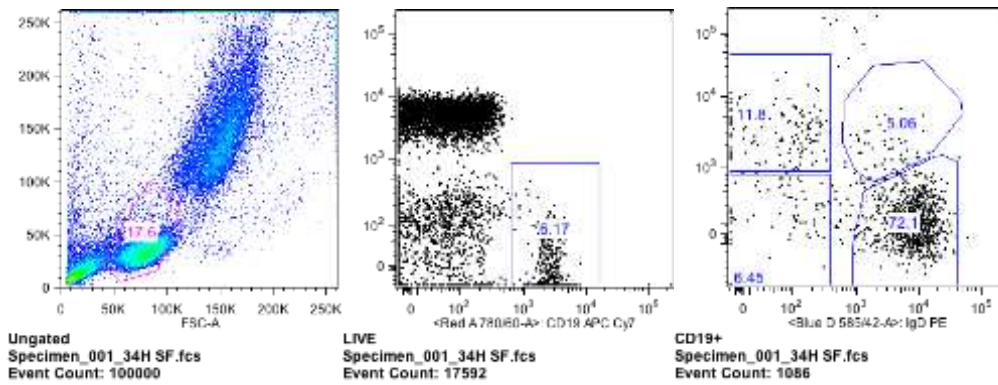
**SUJETO 32 (Clasificación IgD/CD27)**



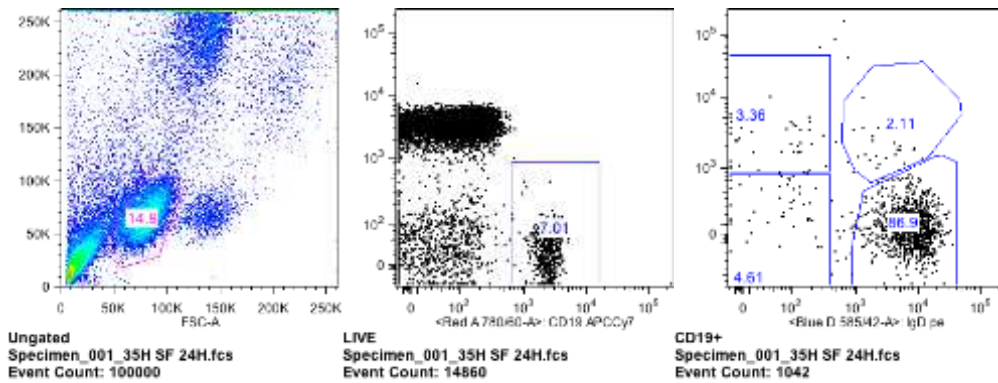
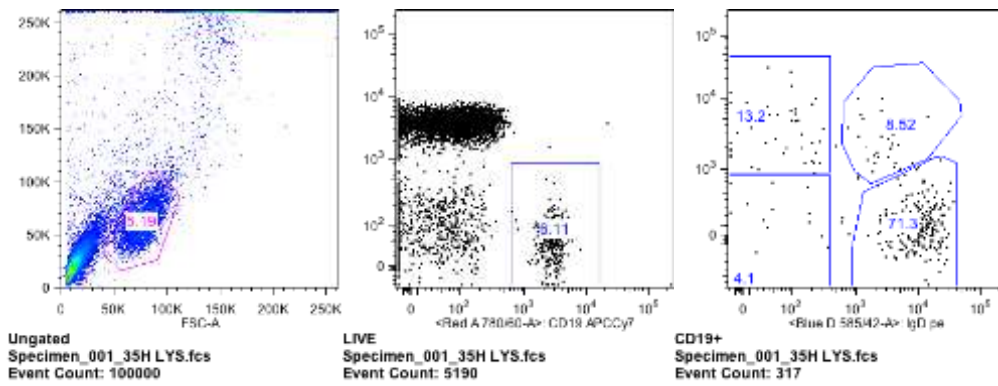
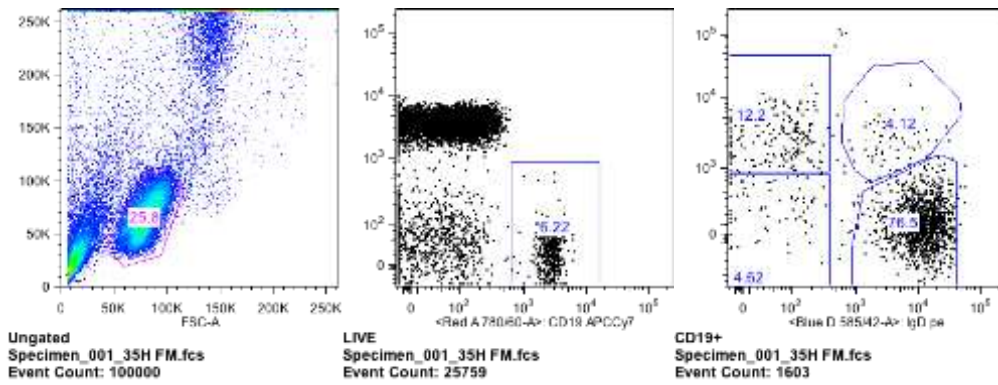
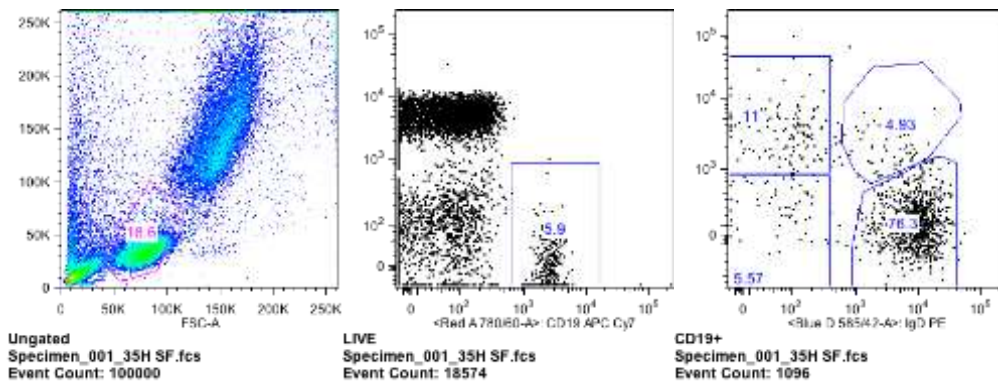
**SUJETO 33 (Clasificación IgD/CD27)**



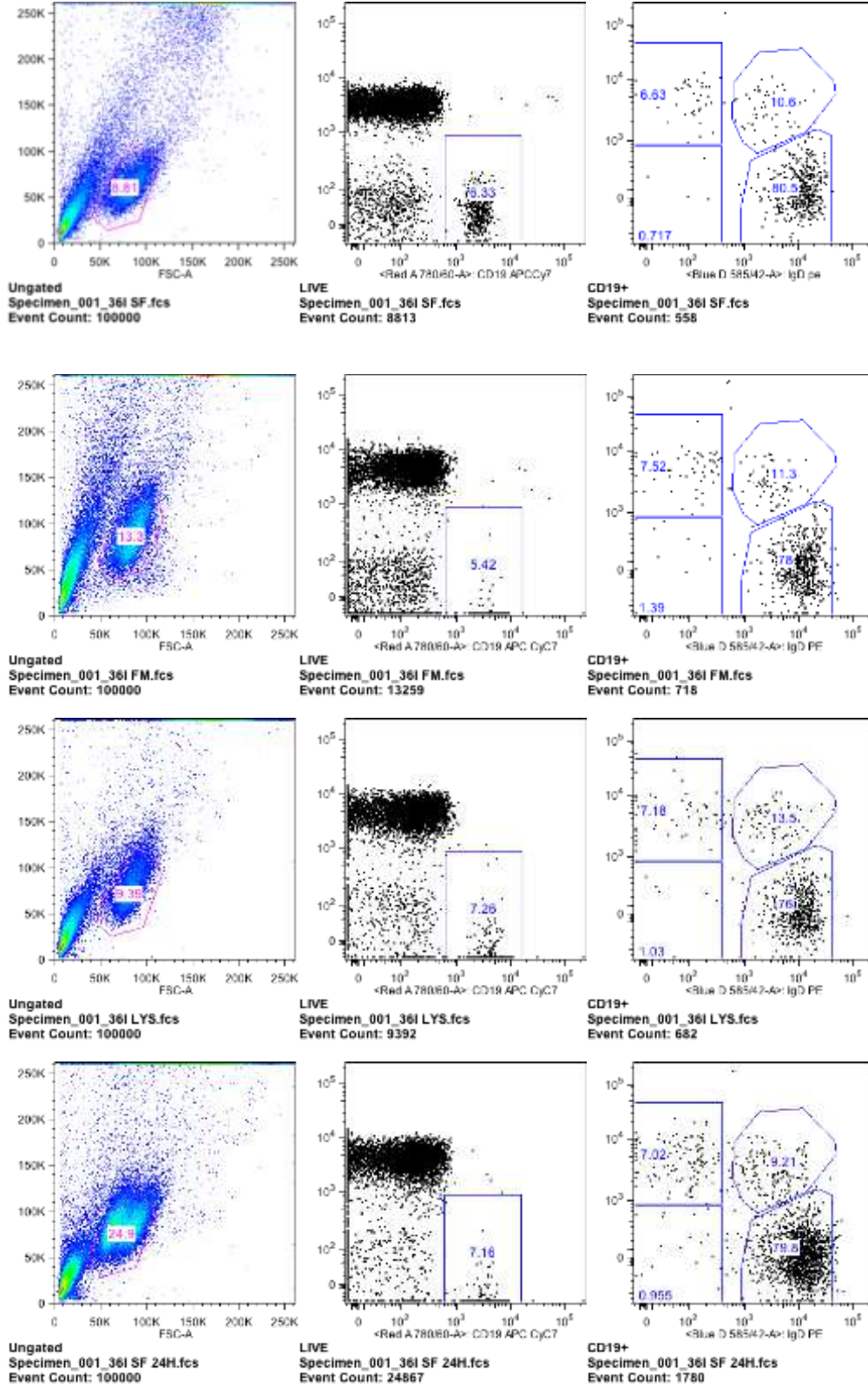
**SUJETO 34 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 35 (Clasificación IgD/CD27)**

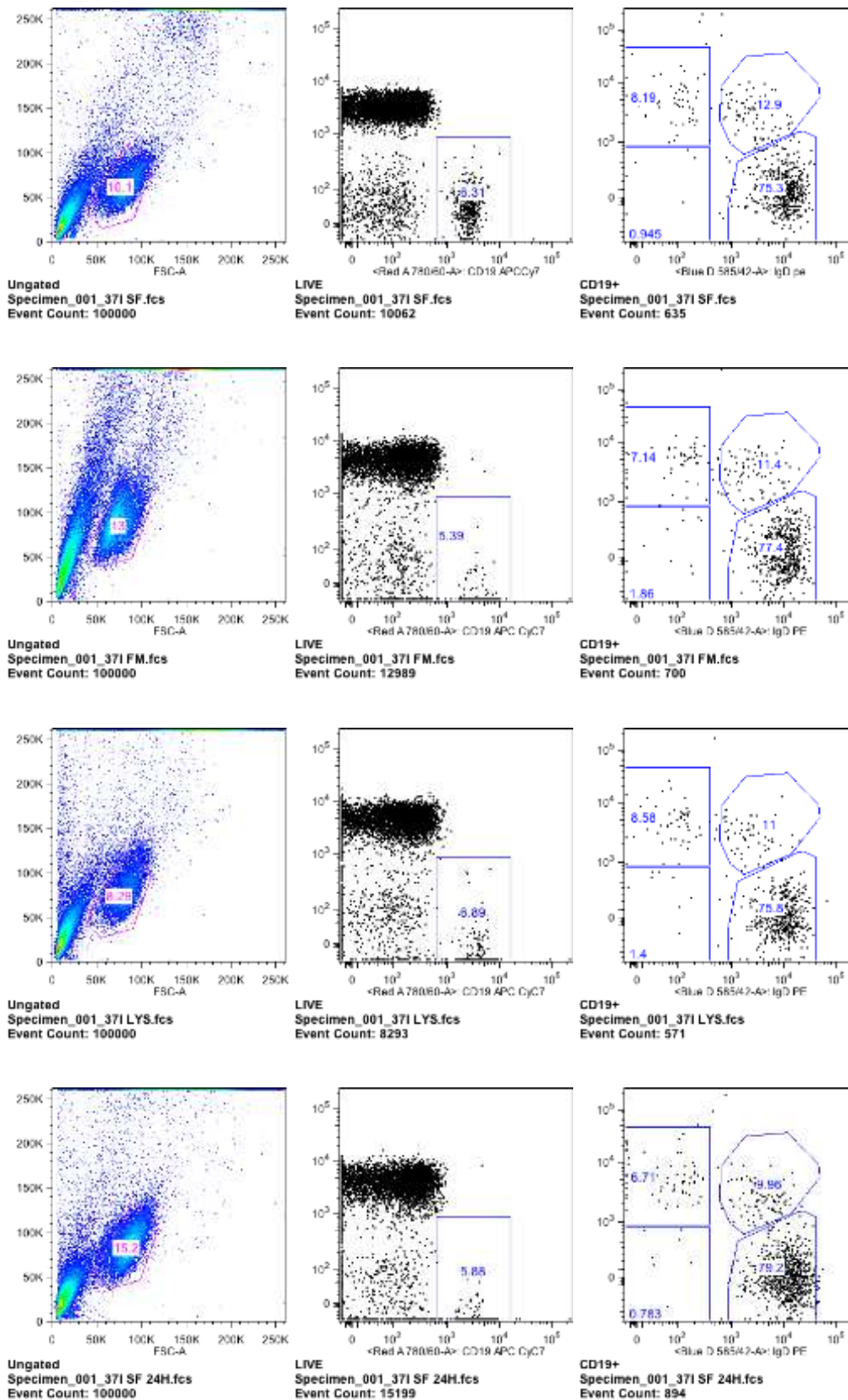


**SUJETO 36 (Clasificación IgD/CD27)**

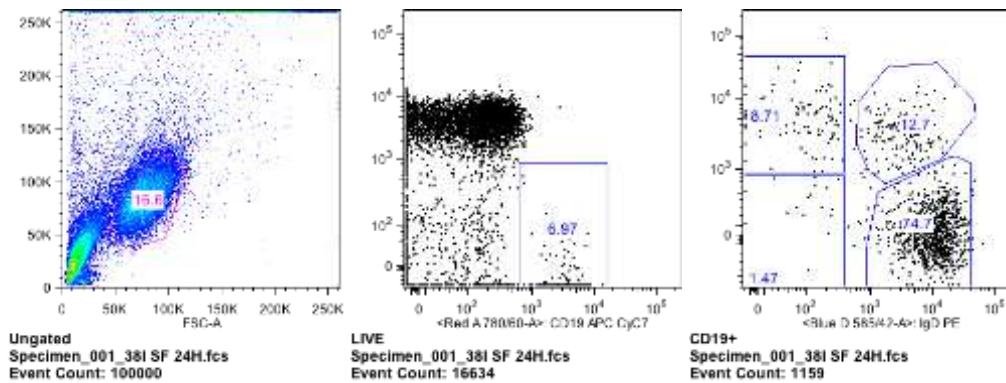
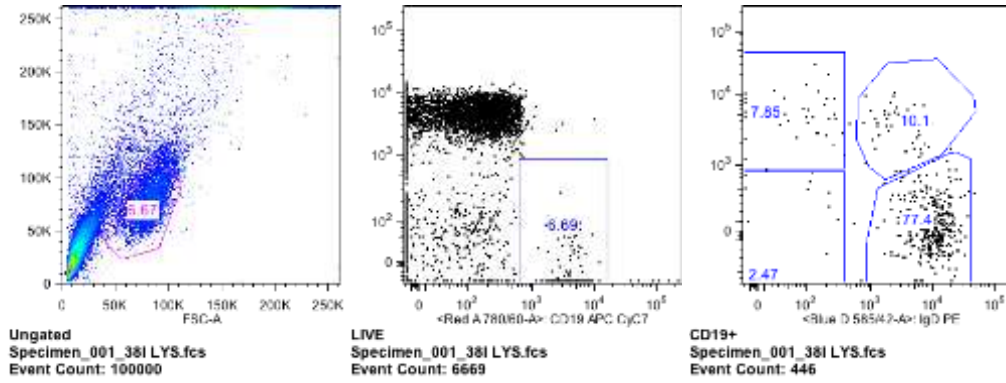
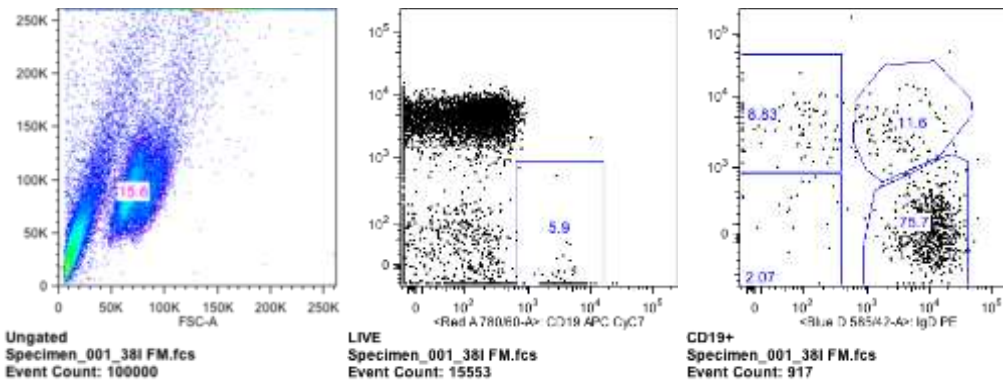
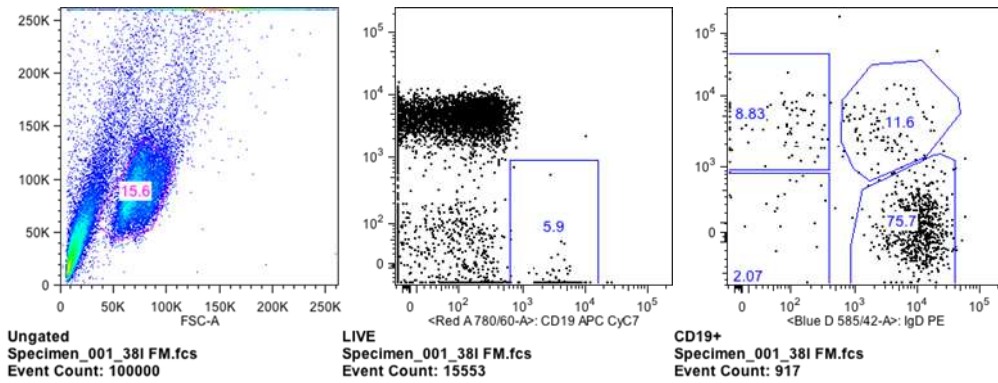




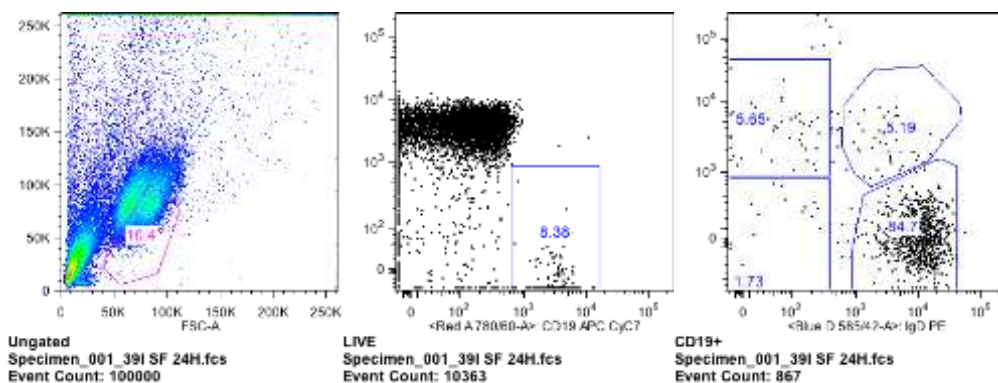
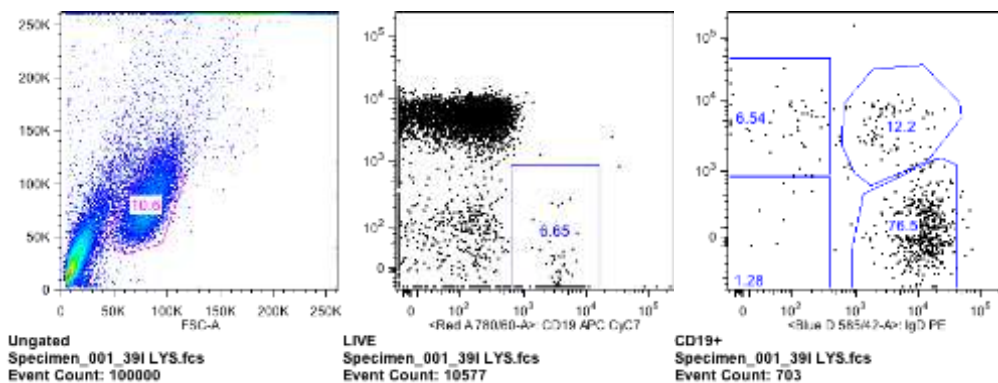
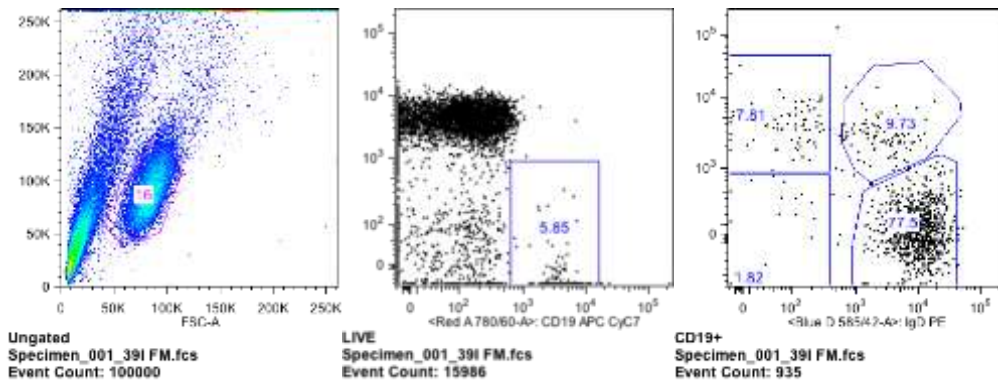
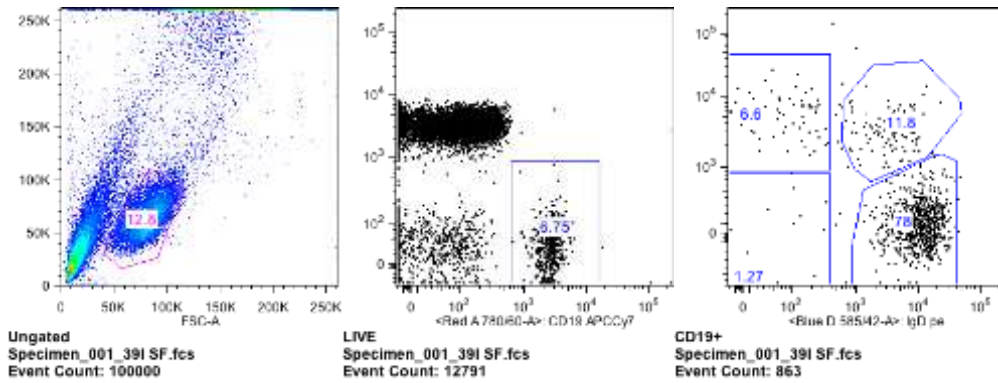
### SUJETO 37 (Clasificación IgD/CD27)



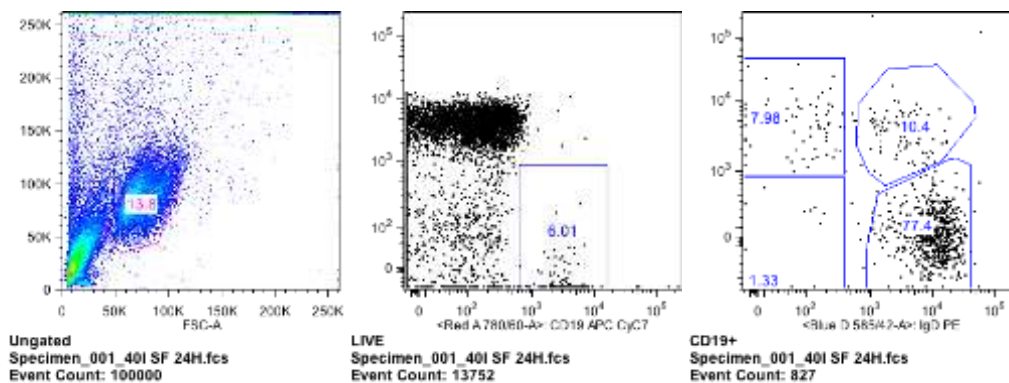
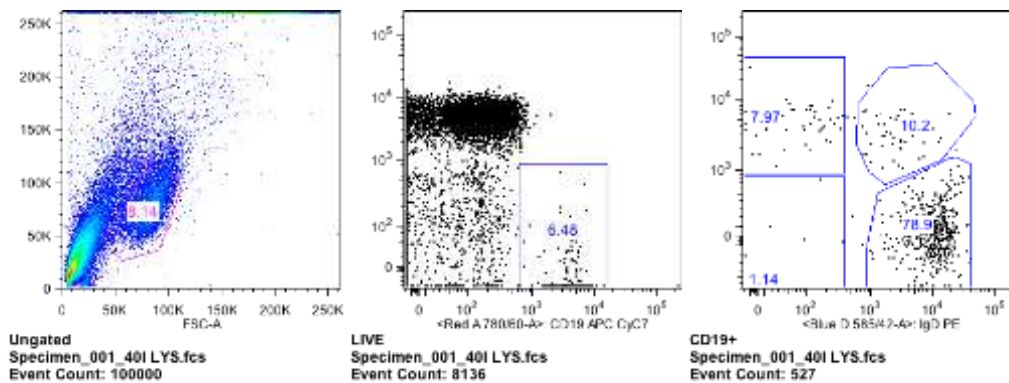
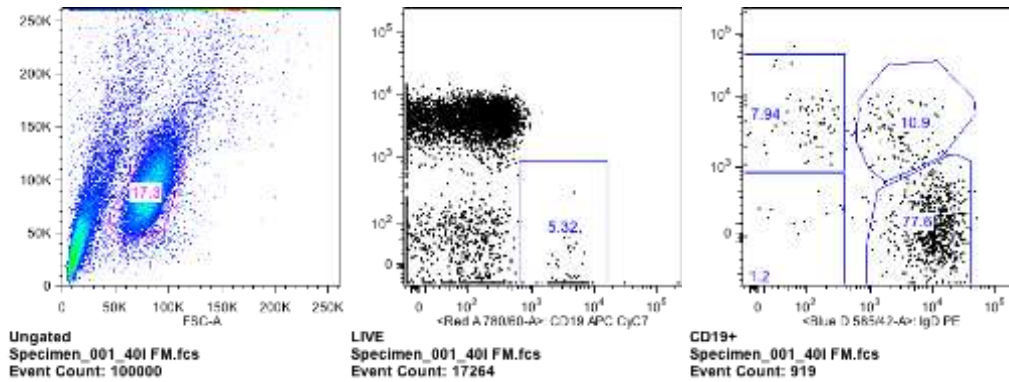
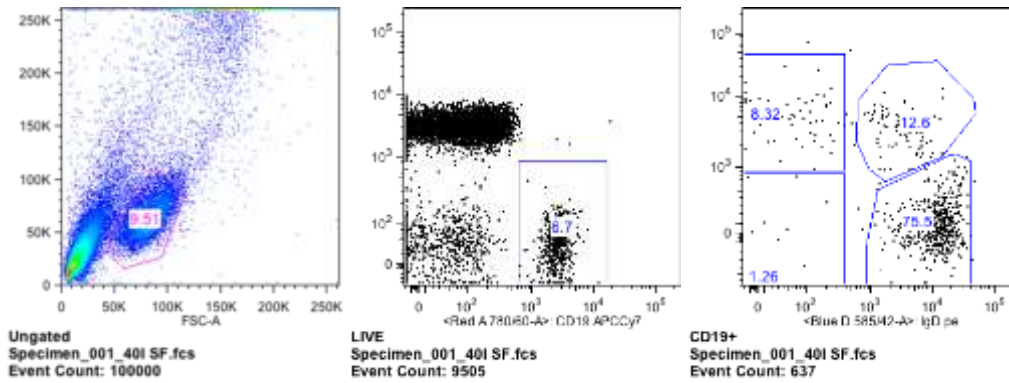
**SUJETO 38 (Clasificación IgD/CD27)**



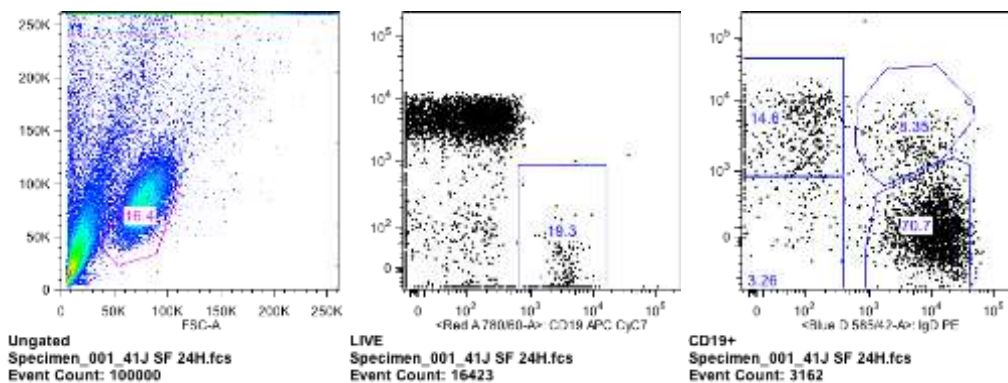
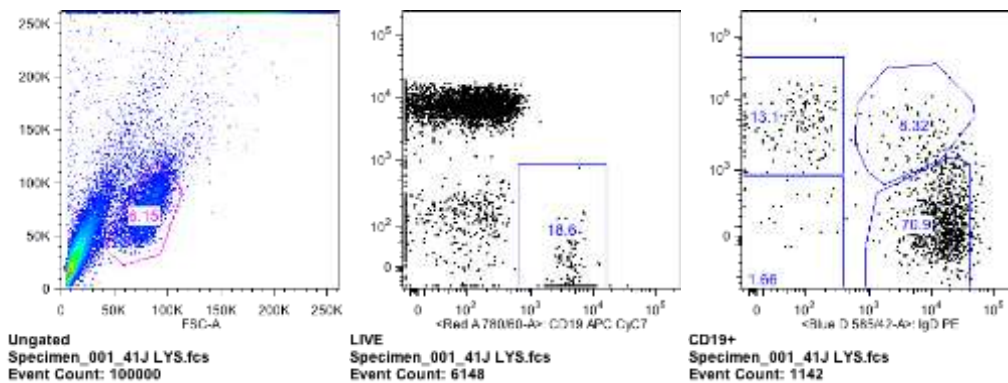
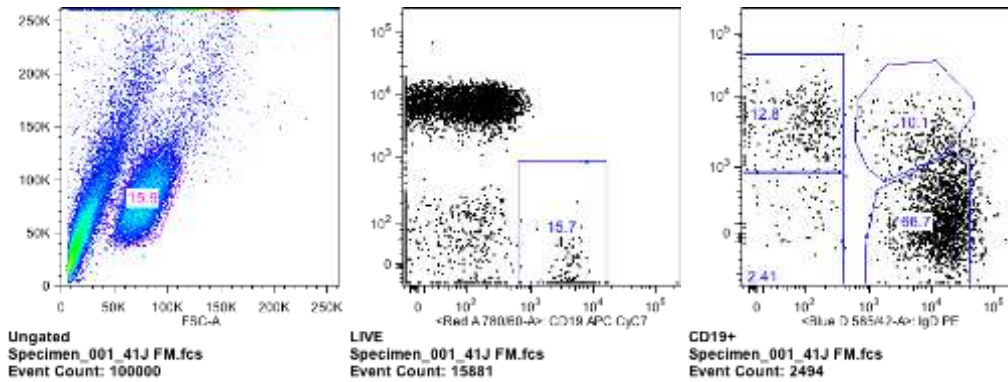
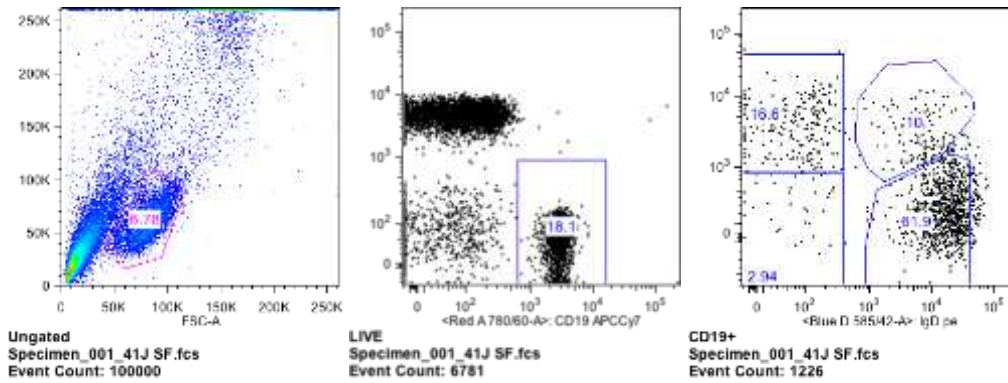
**SUJETO 39 (Clasificación IgD/CD27)**



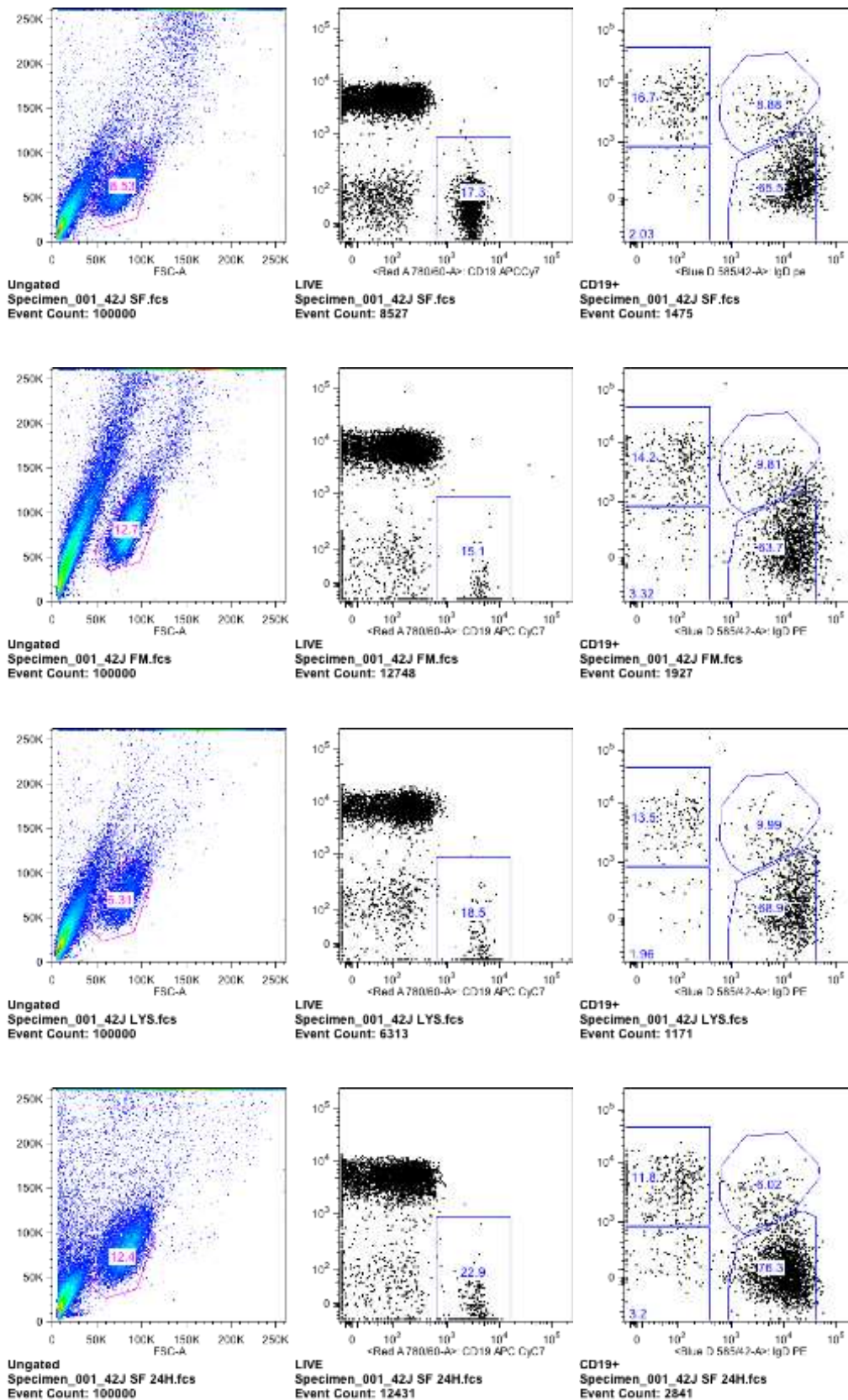
**SUJETO 40 (Clasificación IgD/CD27)**



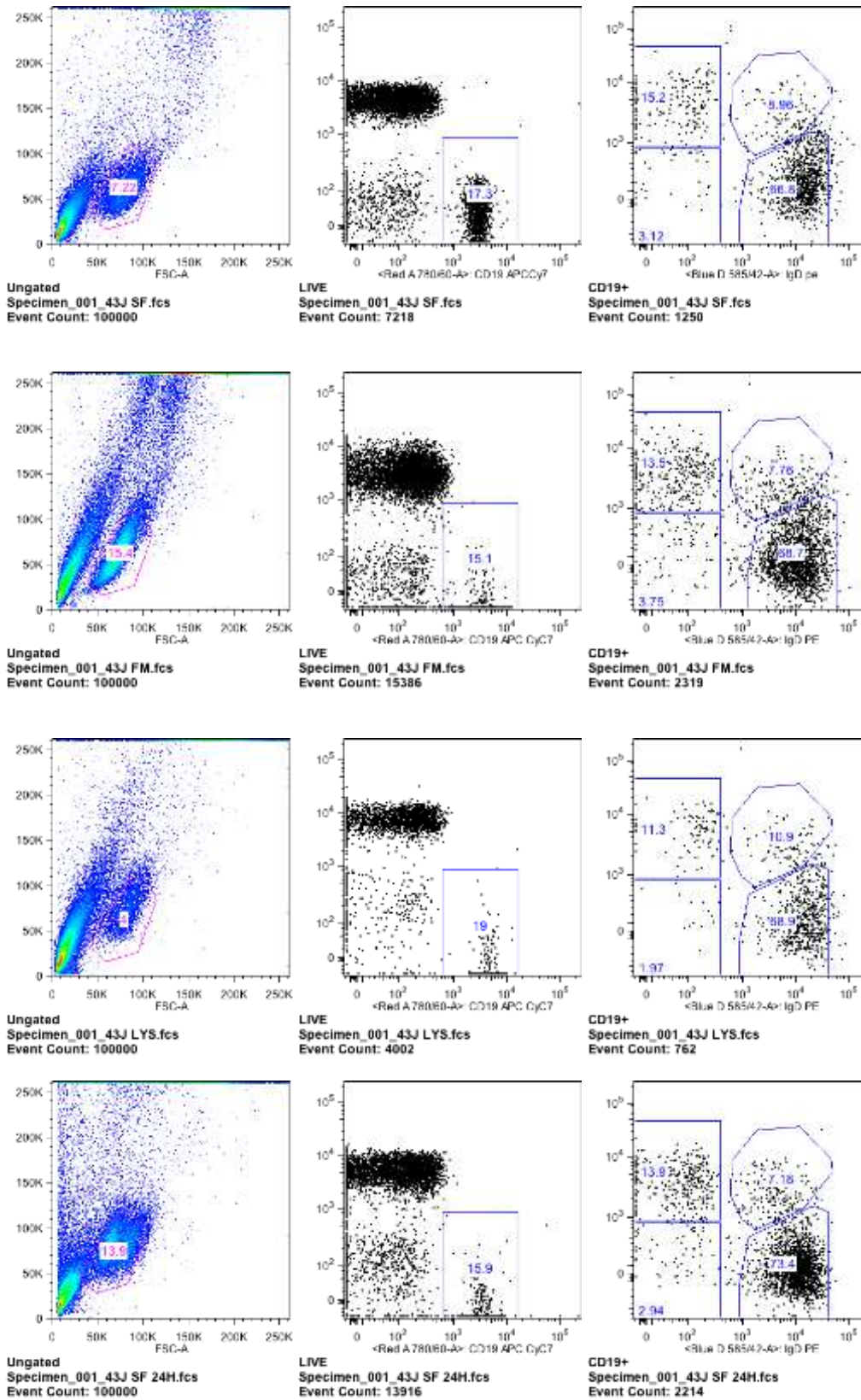
**SUJETO 41 (Clasificación IgD/CD27)**



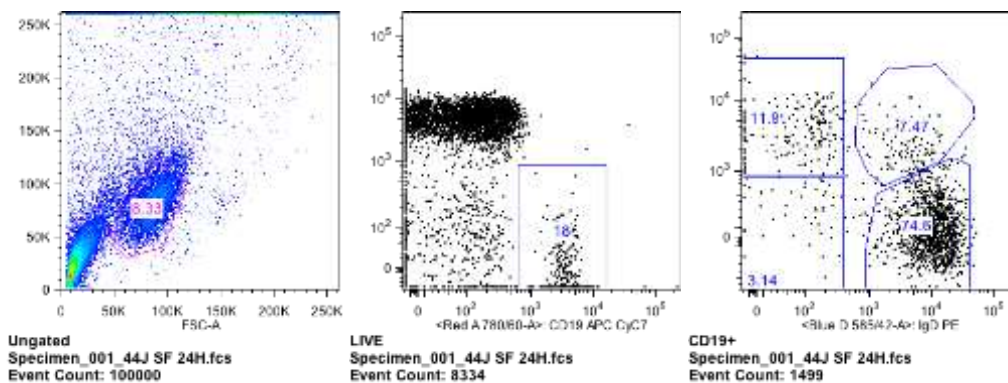
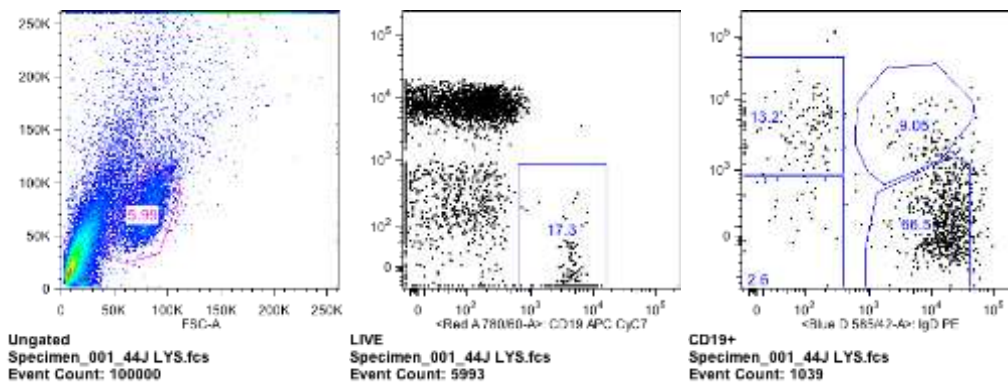
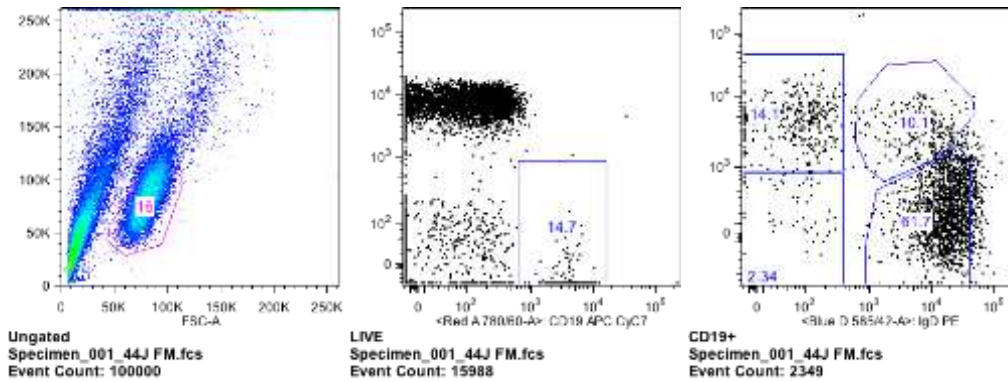
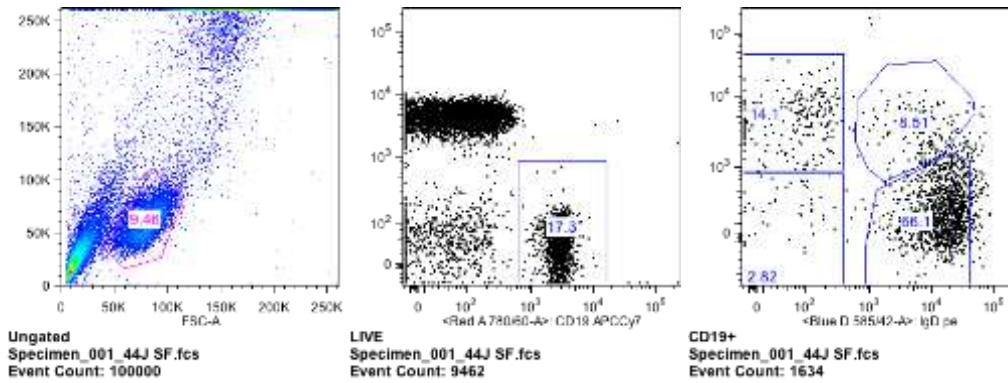
**SUJETO 42 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 43 (Clasificación IgD/CD27)**

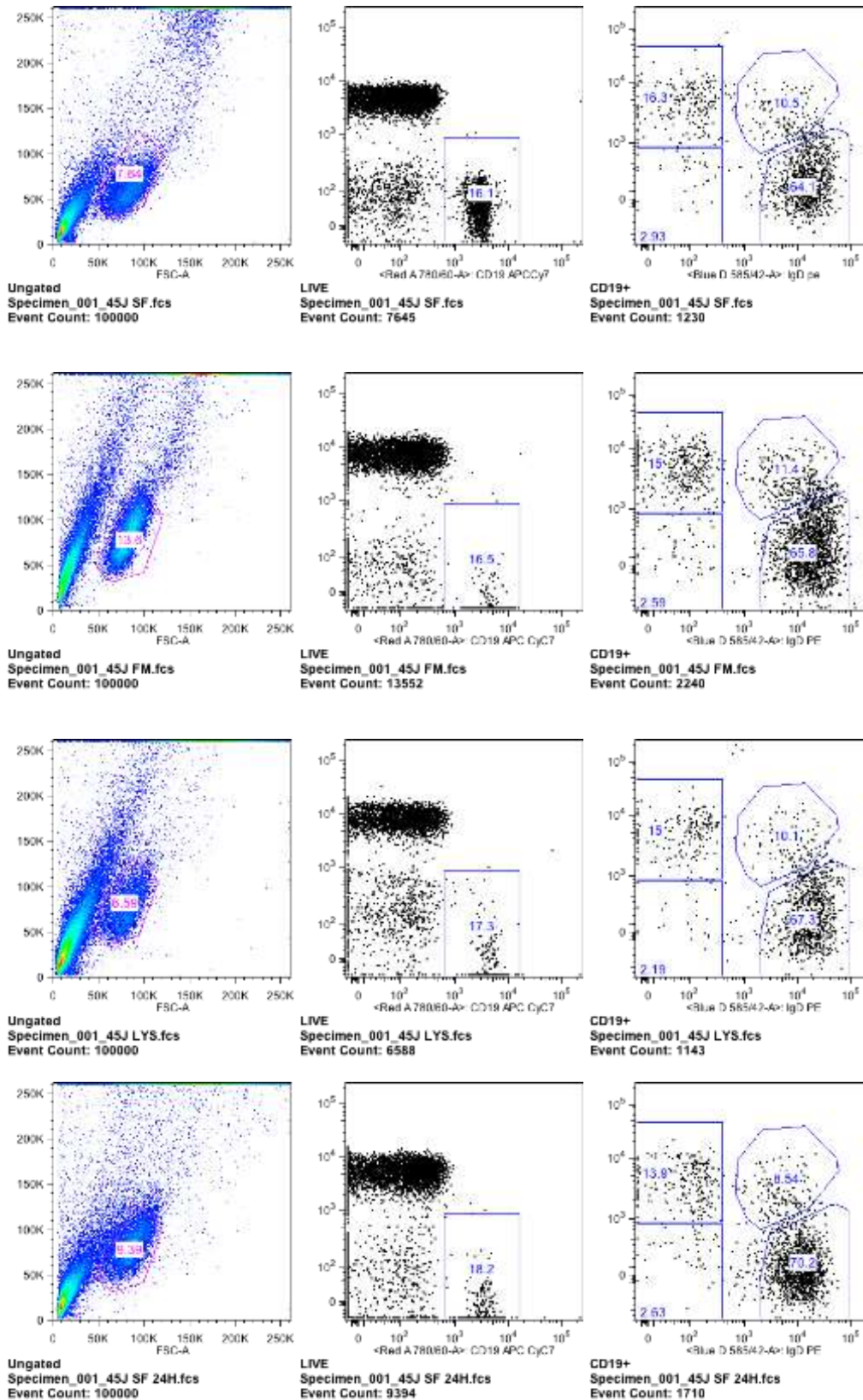


**SUJETO 44 (Clasificación IgD/CD27)**

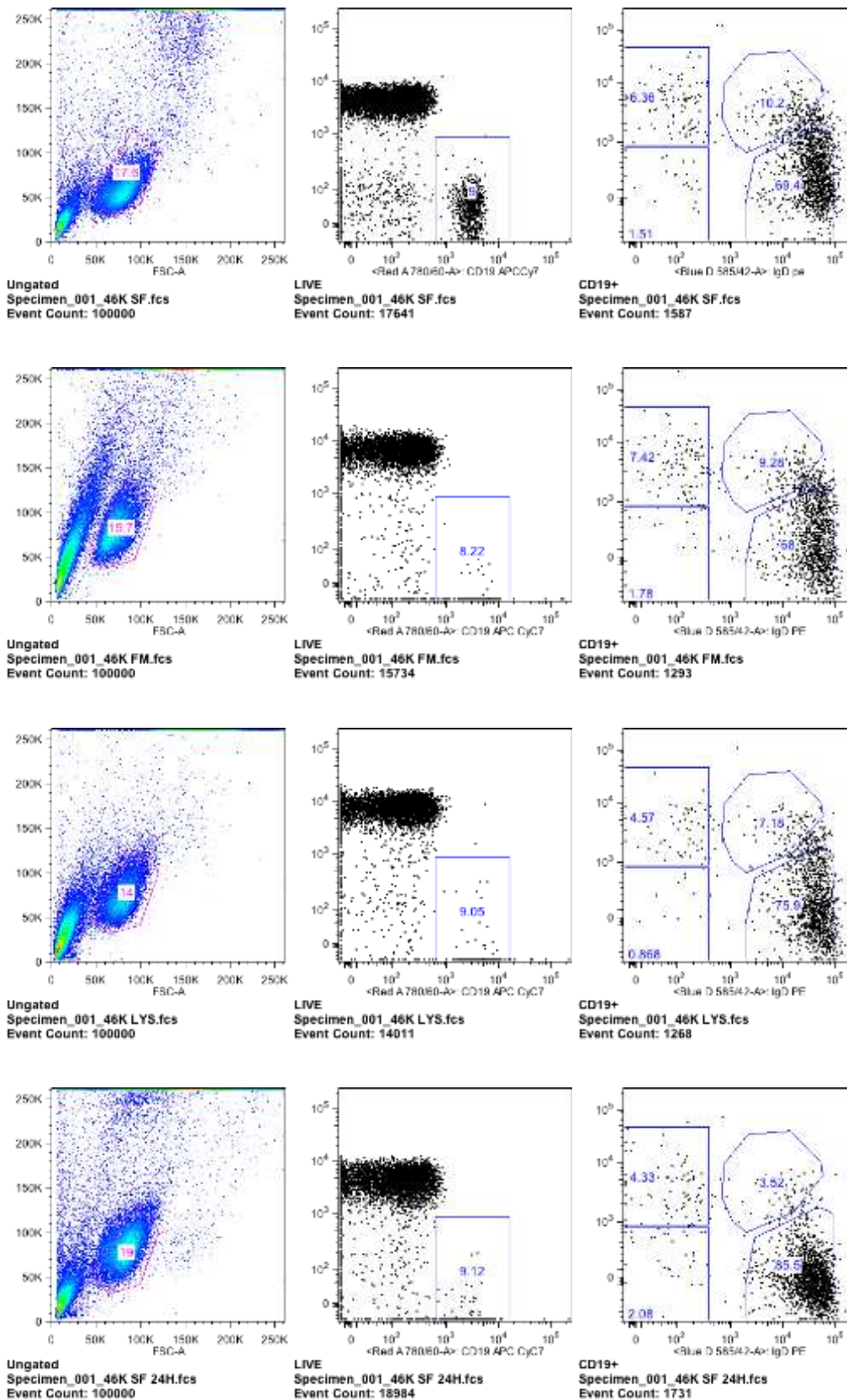




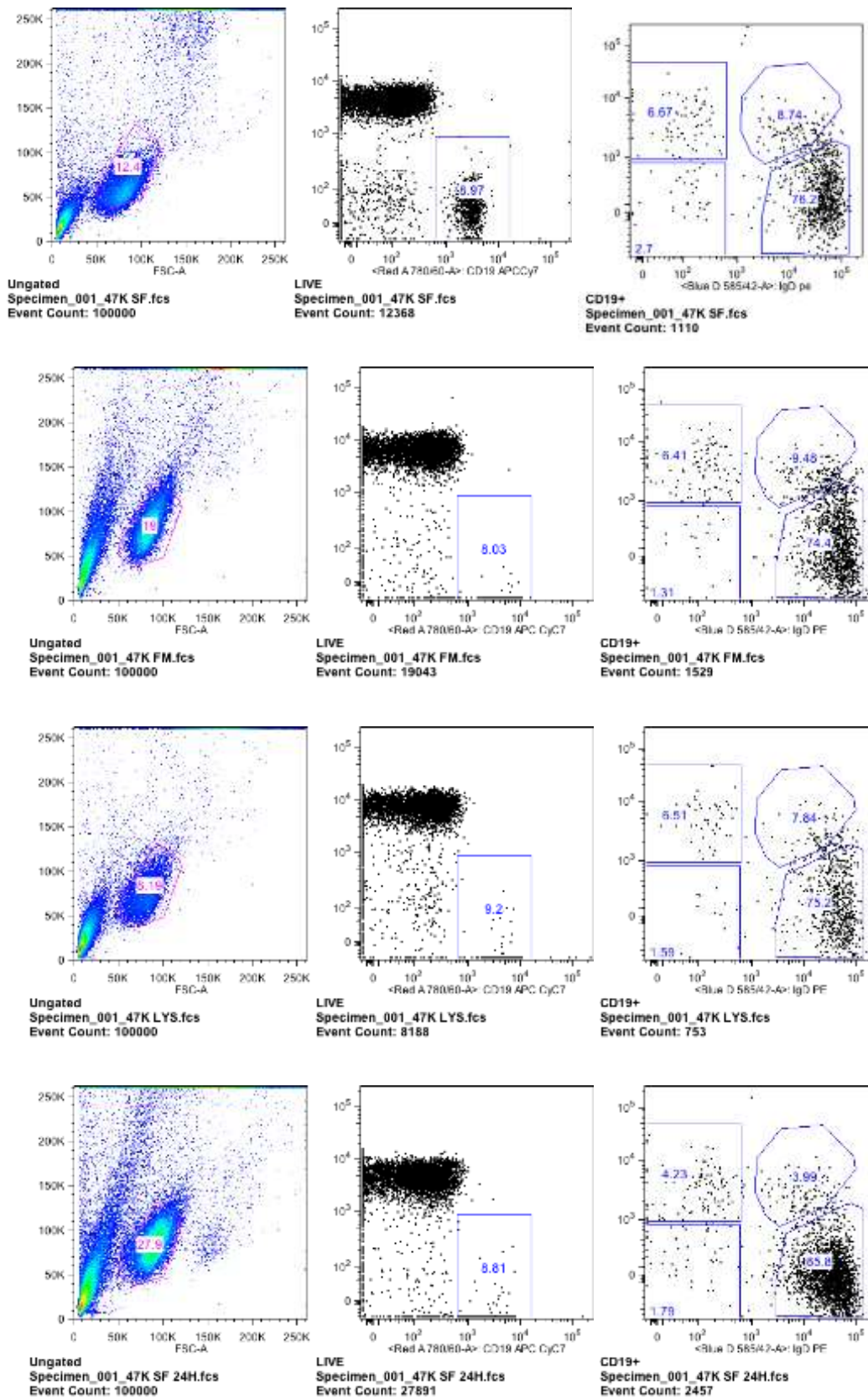
**SUJETO 45 (Clasificación IgD/CD27)**



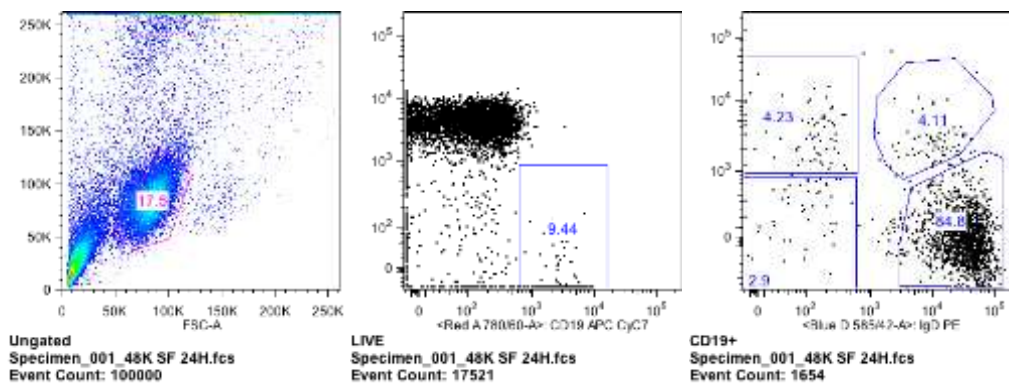
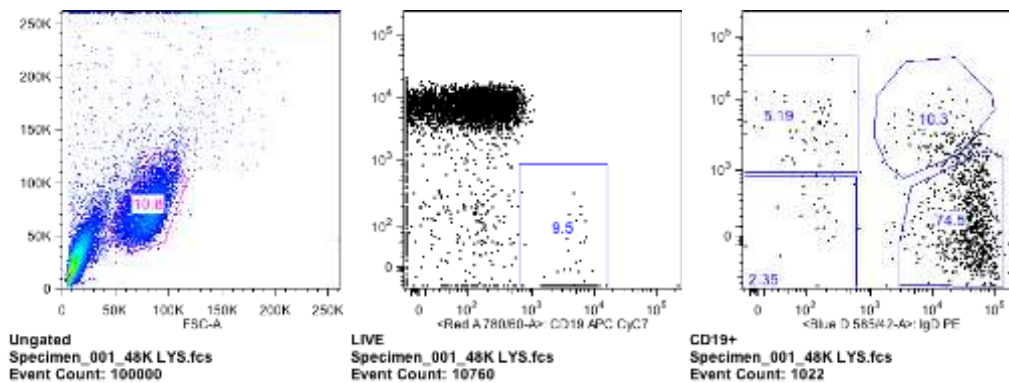
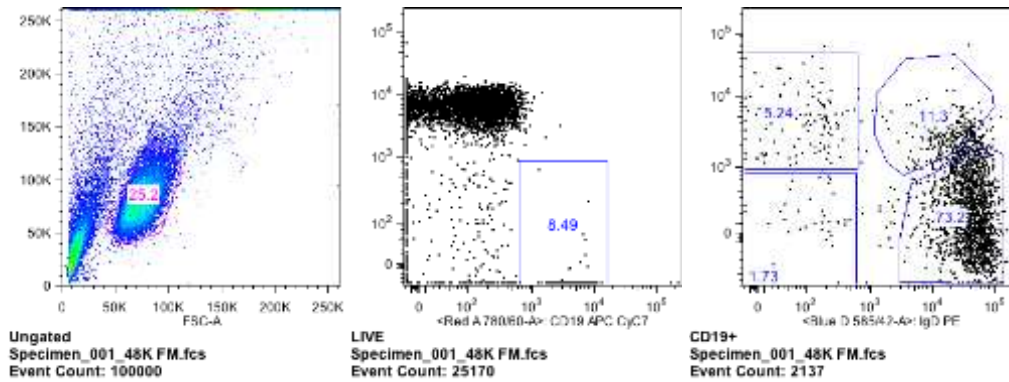
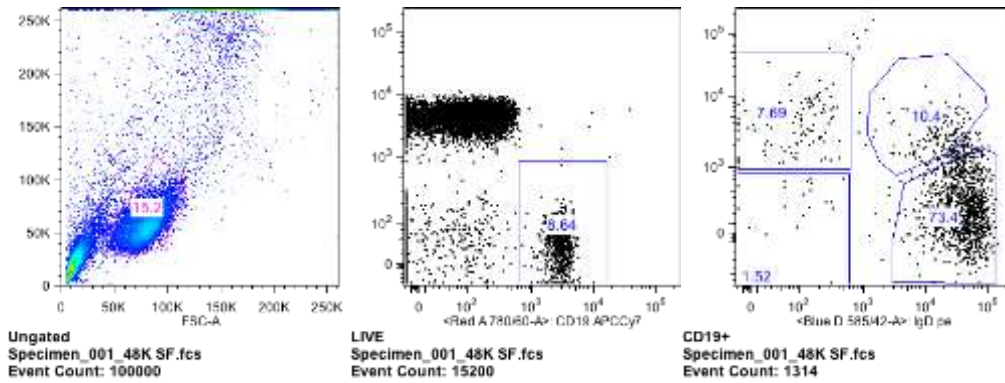
**SUJETO 46 (Clasificación IgD/CD27)**



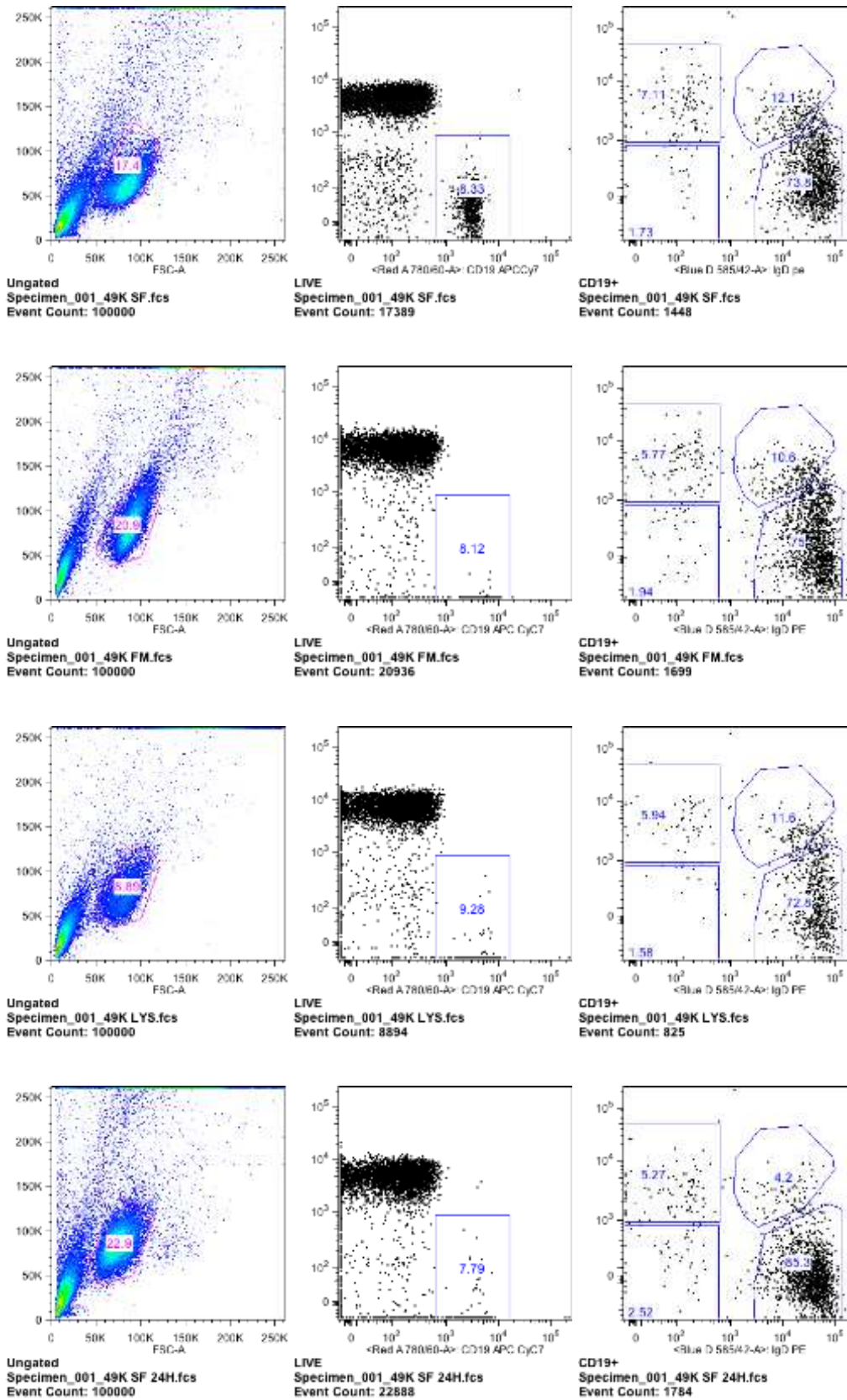
**SUJETO 47 (Clasificación IgD/CD27)**



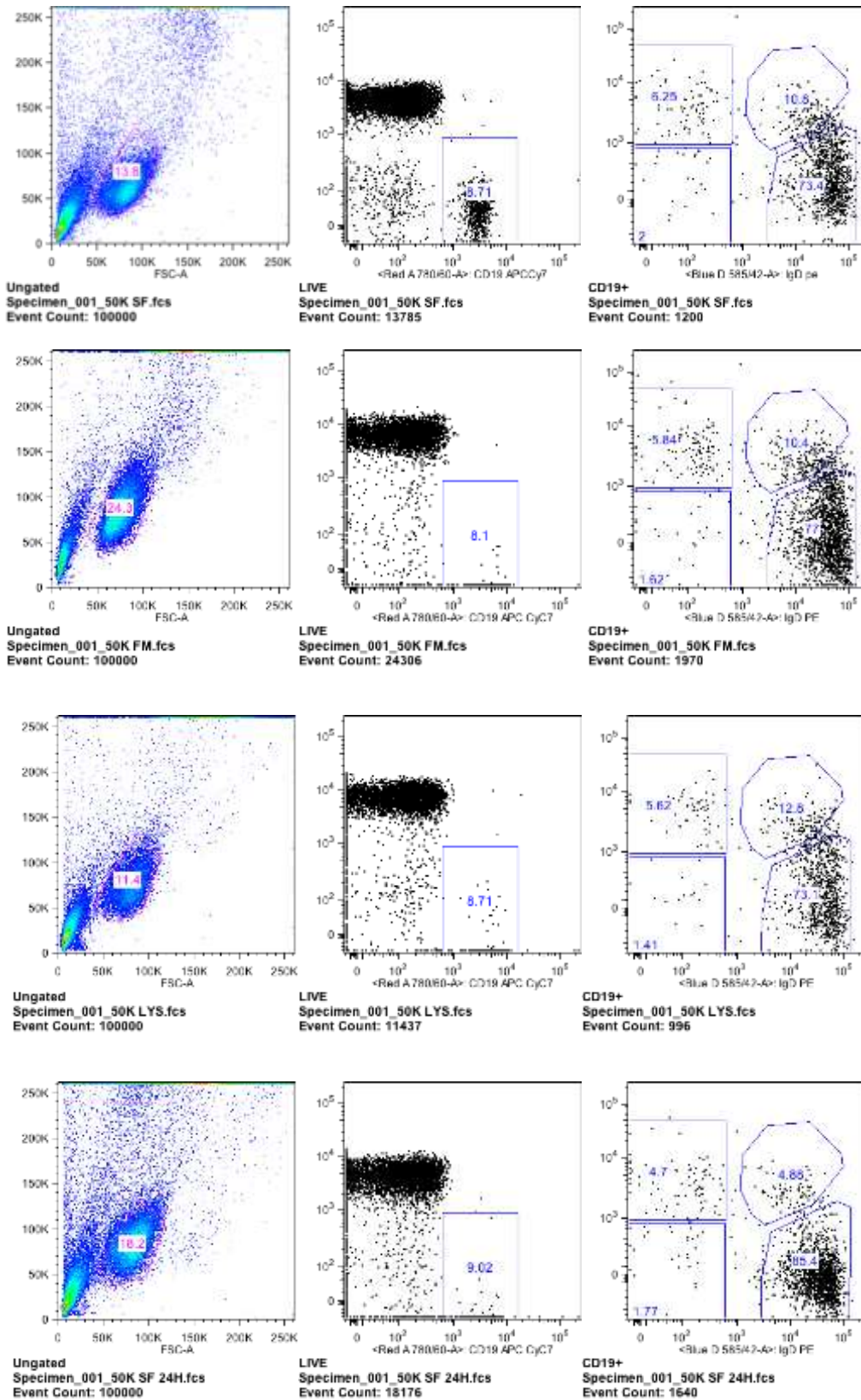
**SUJETO 48 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 49 (Clasificación IgD/CD27)**



**SUJETO 50 (Clasificación IgD/CD27)**



## 9.2. ANEXO II. Clasificación B mature (IgD/CD38).

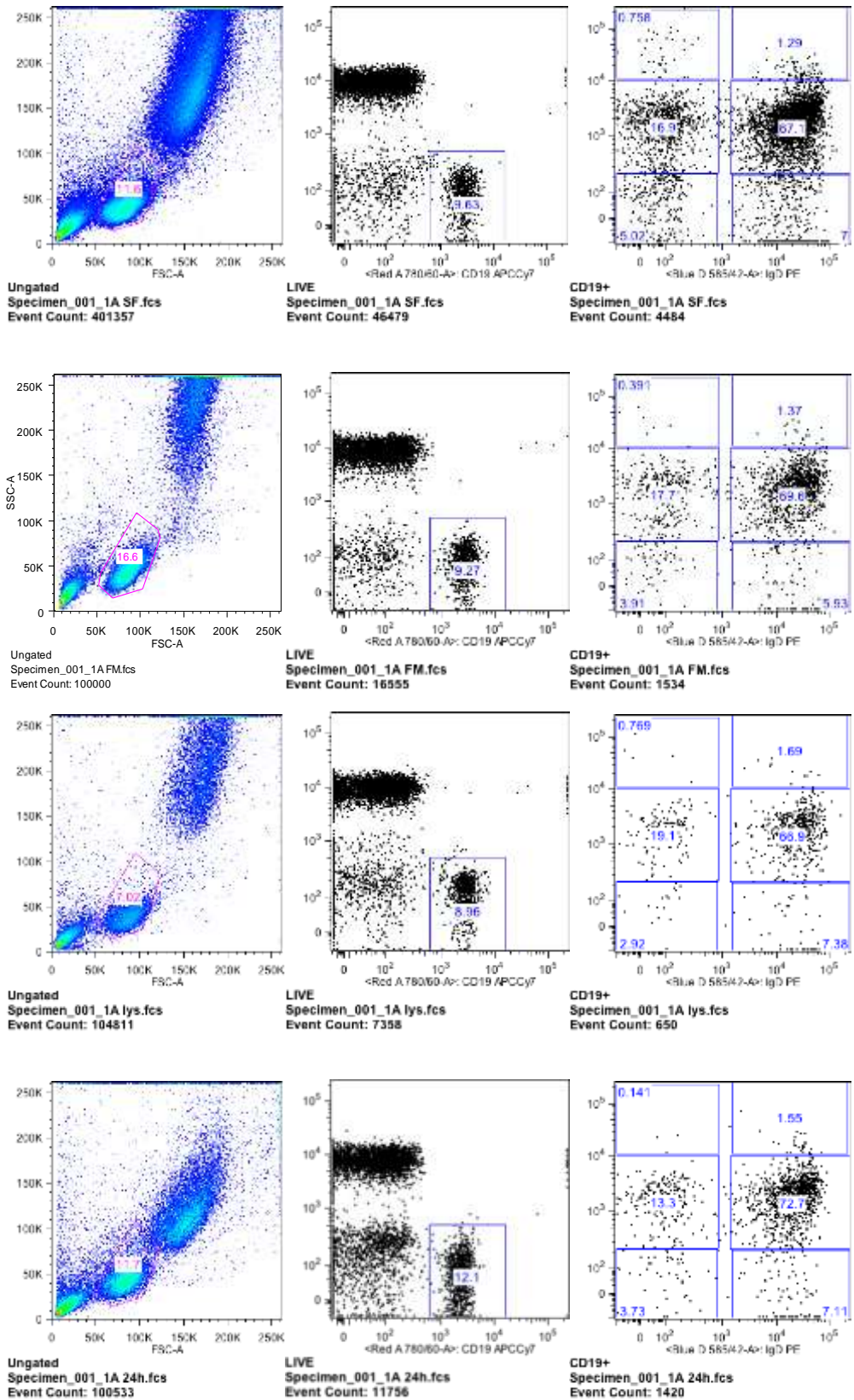
---

A continuación se adjuntan los resultados de la citometría de flujo realizada sobre todos los pacientes según los distintos procesamientos de muestras, aplicados a la Clasificación B mature. .

De este modo se reflejan a cada uno de los 50 pacientes (1-50), los resultados obtenidos por cada uno de los cuatro procedimientos en estudio.

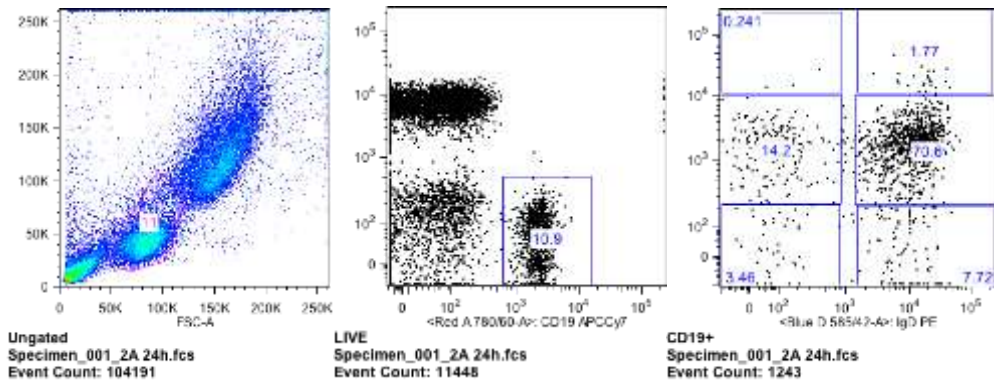
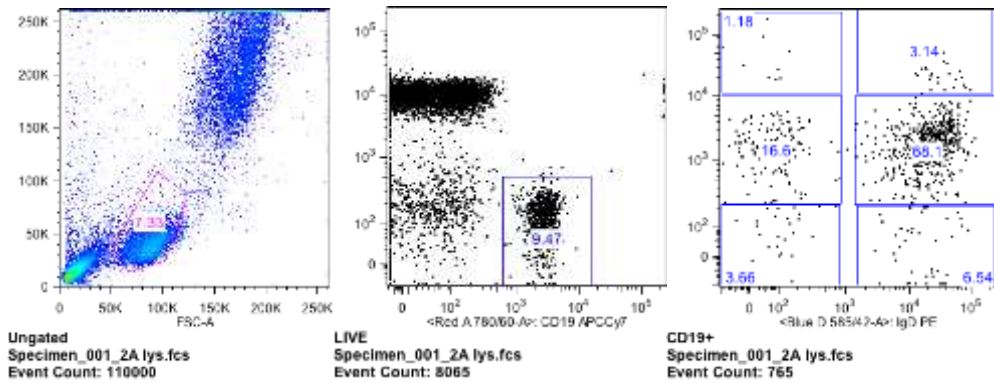
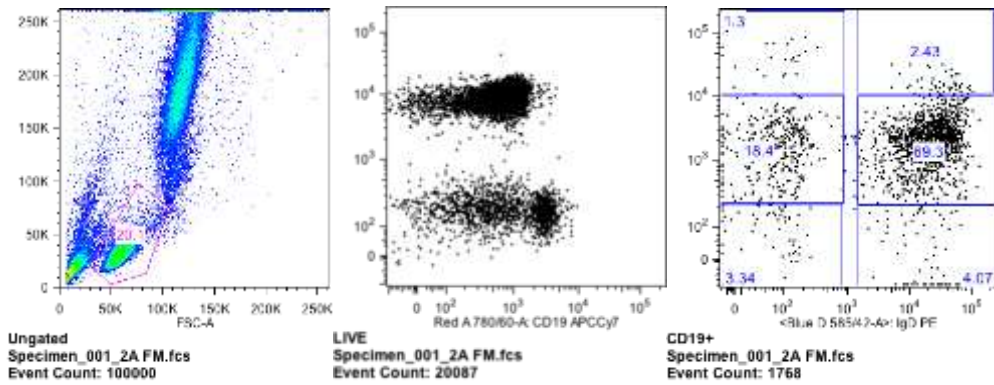
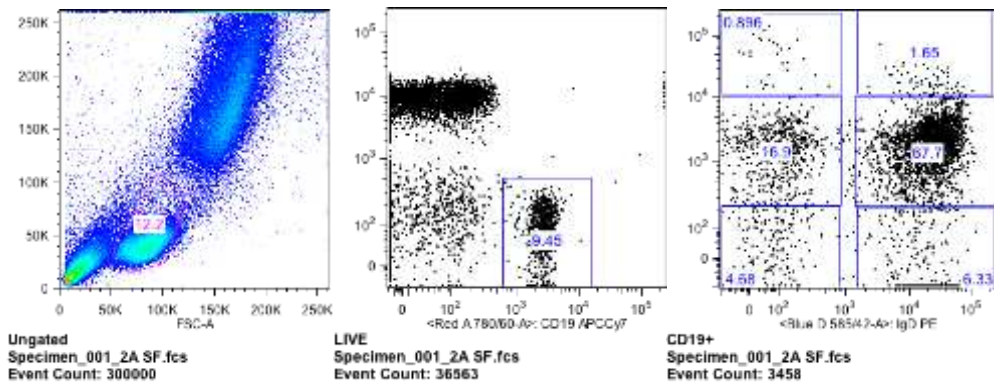
**Nota aclaratoria:** (1) En rojo se expresan los plots que han sido incorrectamente valorados por el citómetro; obteniéndose resultados artefactados. (2) Con una cruz –x– se expresan aquellos plots, en los que debido a errores del citómetro no se han podido obtener resultado alguno.

**SUJETO 1 (Clasificación IgD/CD38)**

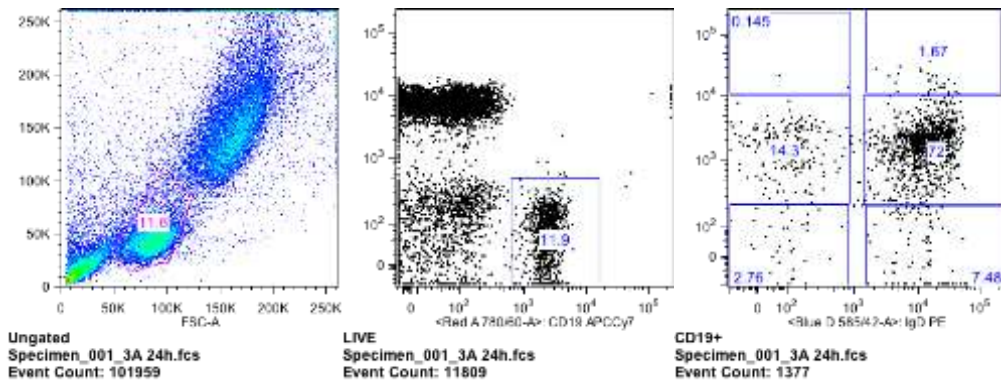
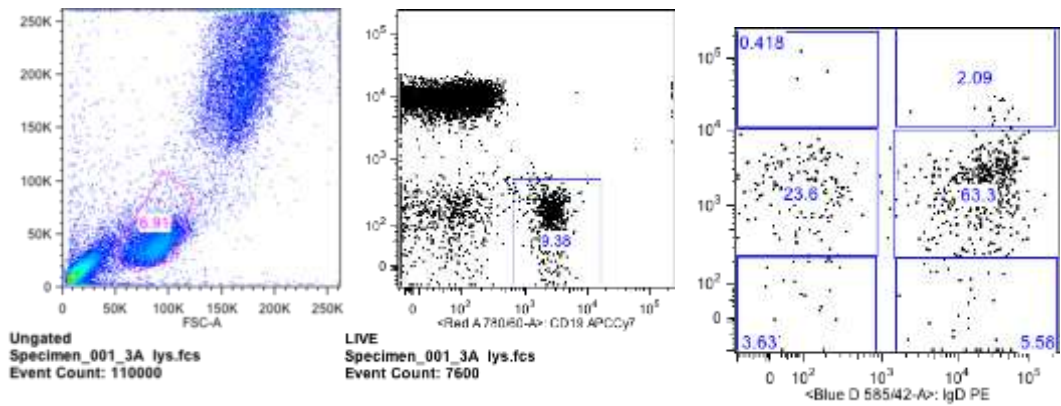
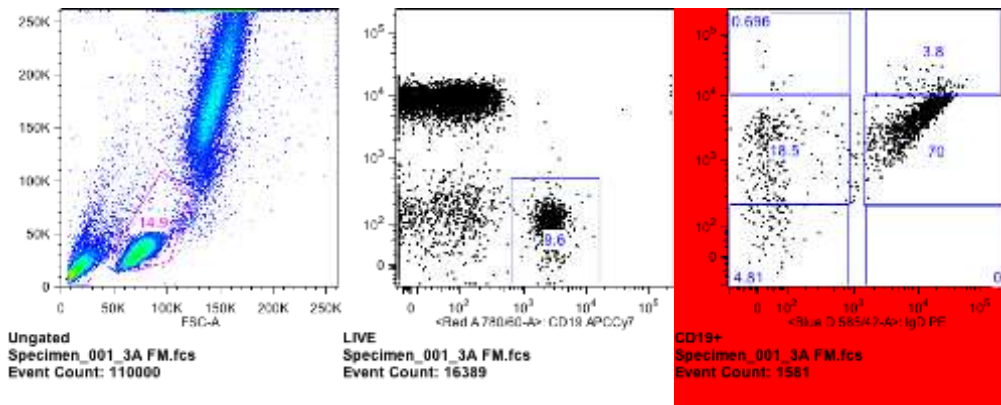
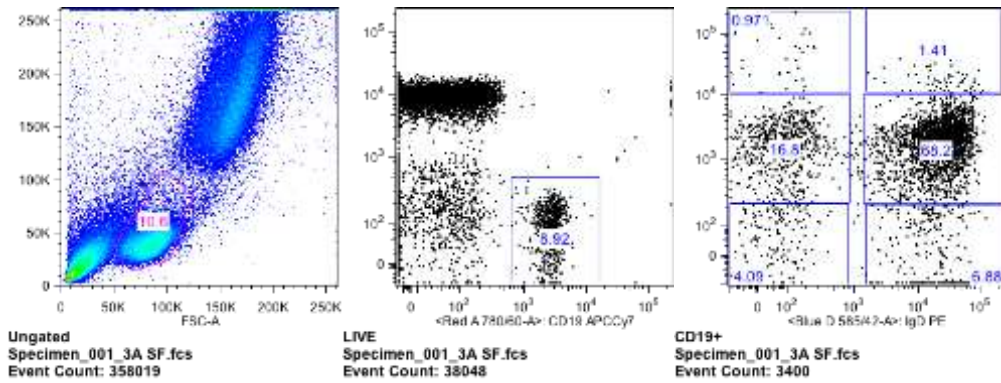




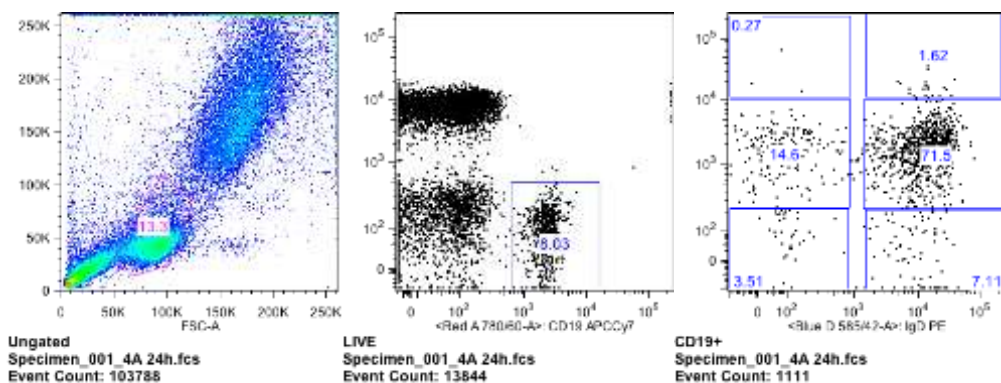
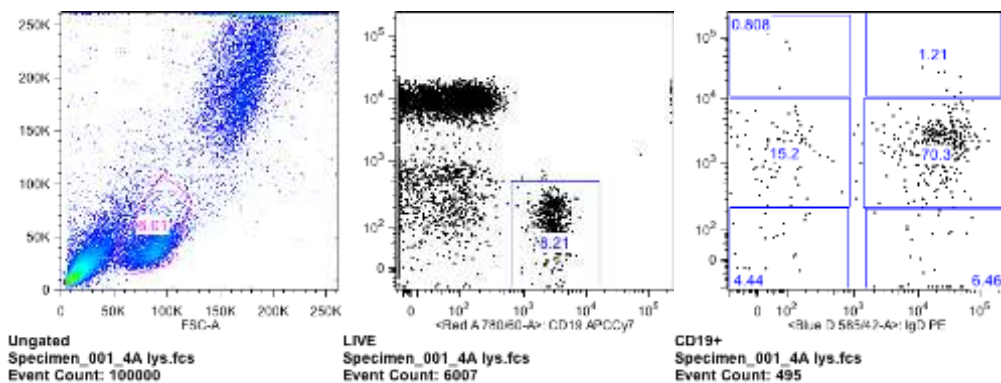
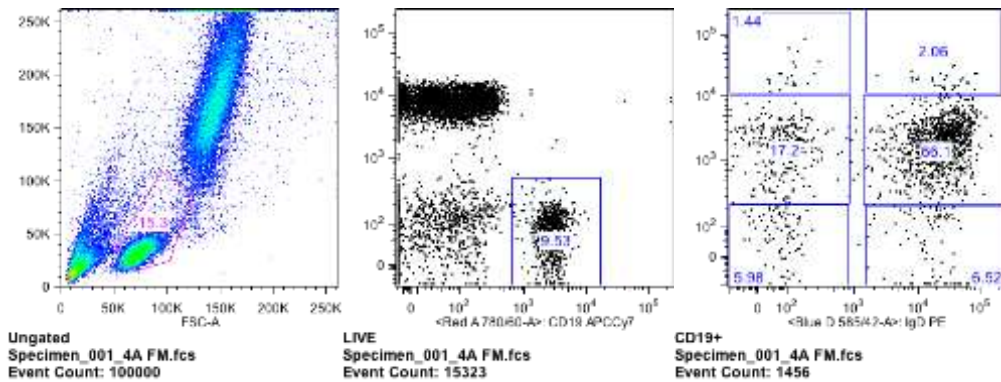
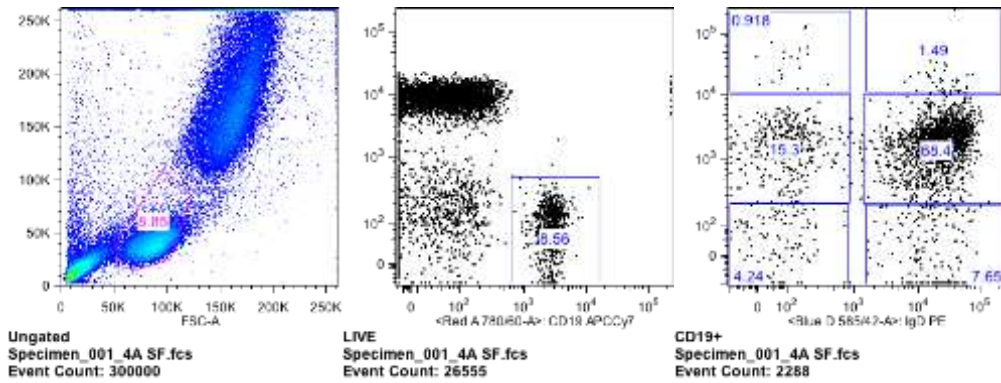
**SUJETO 2 (Clasificación IgD/CD38)**



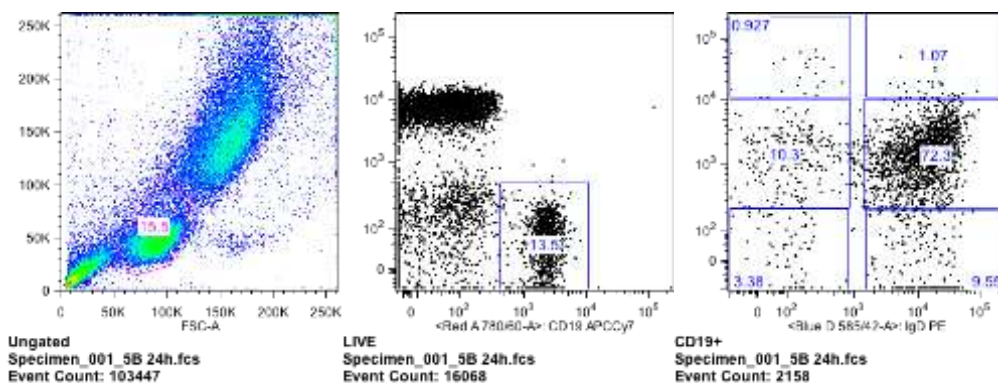
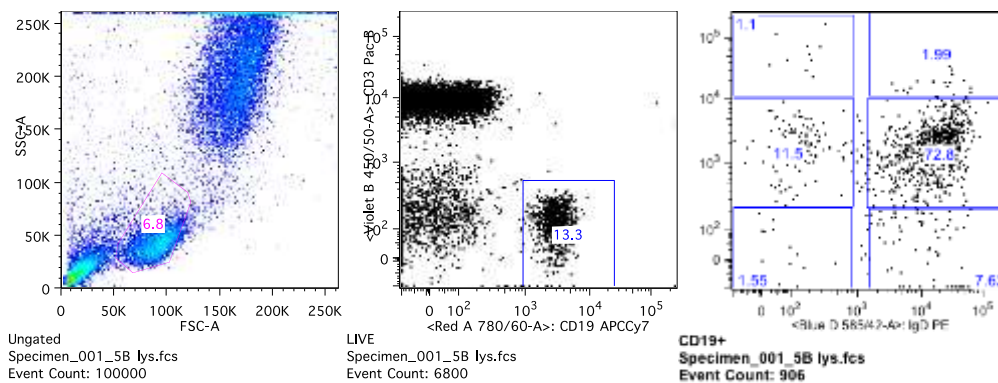
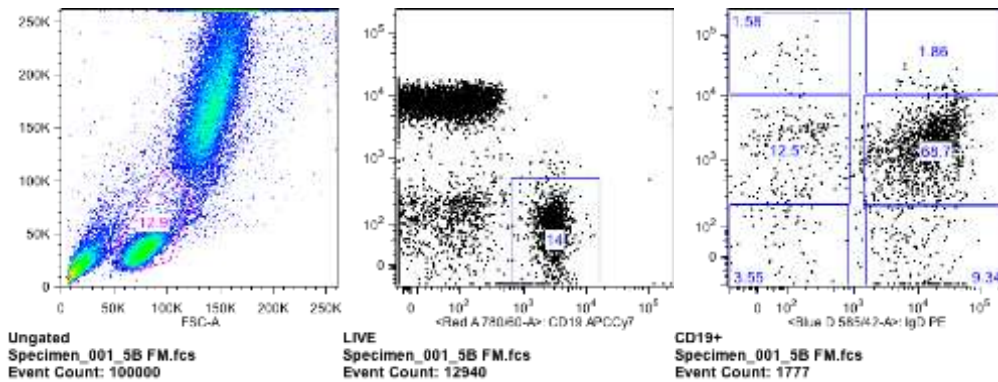
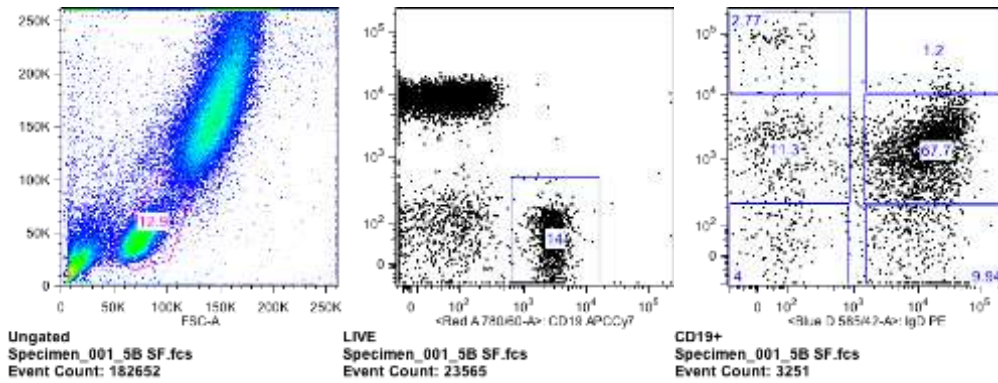
**SUJETO 3 (Clasificación IgD/CD38)**



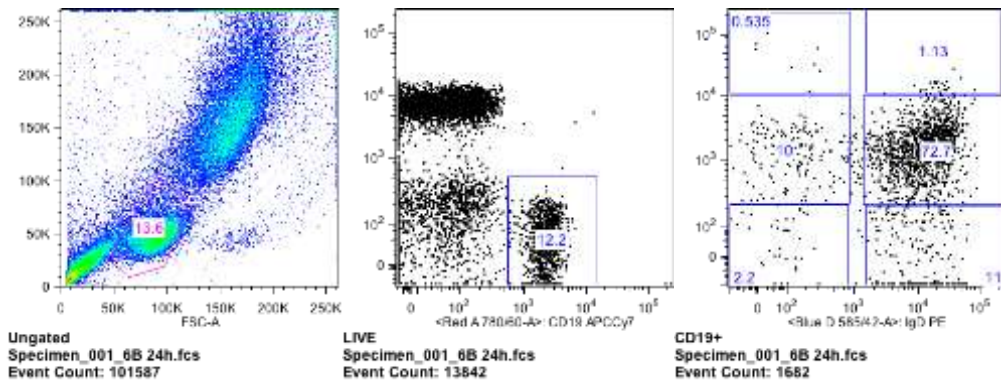
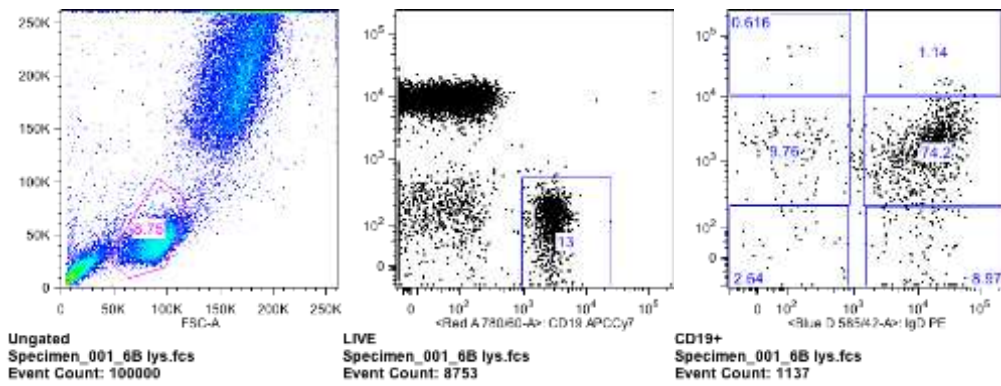
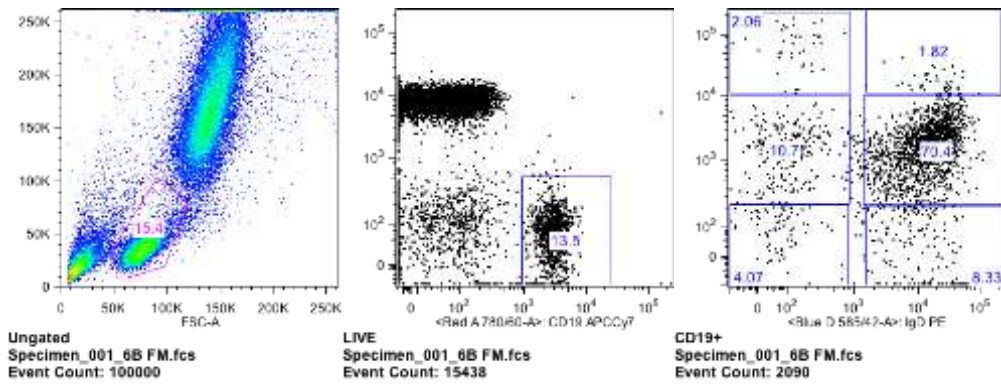
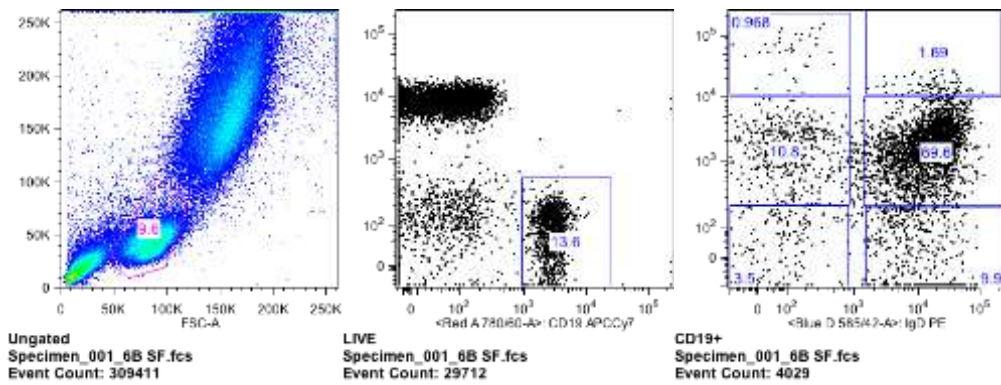
**SUJETO 4 (Clasificación IgD/CD38)**



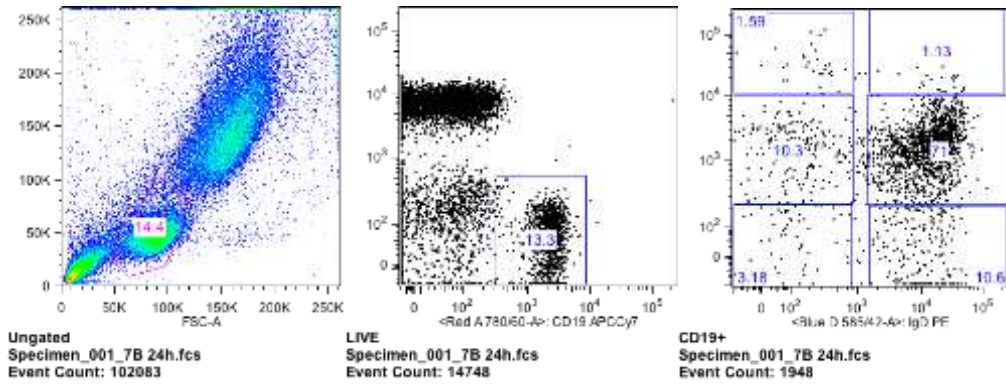
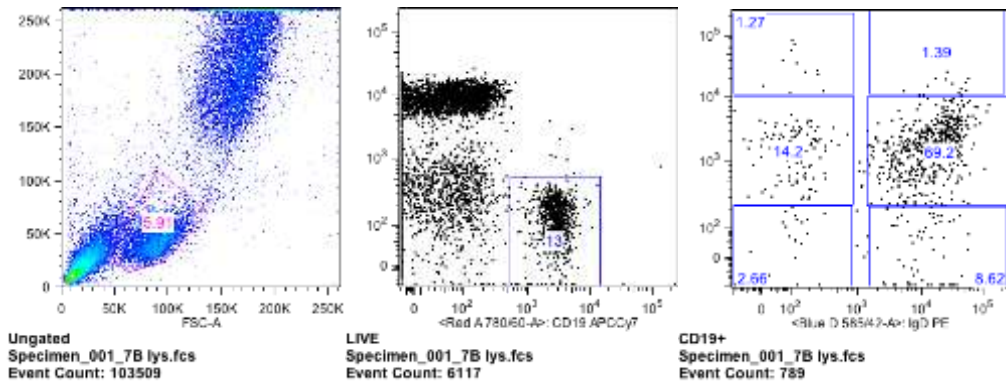
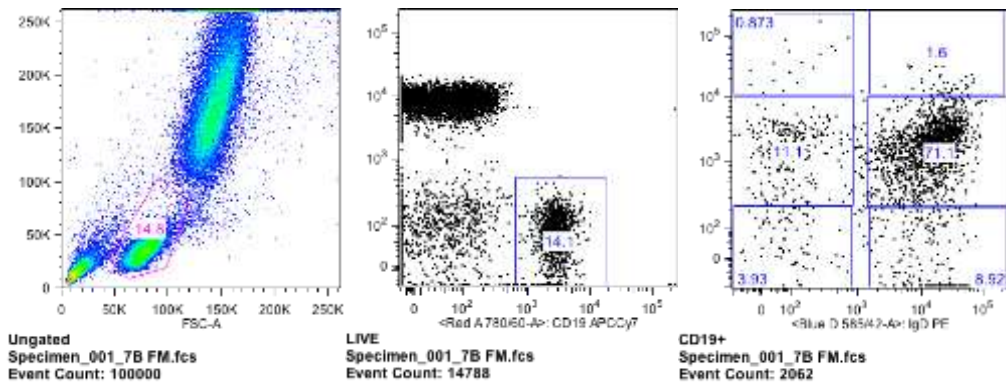
**SUJETO 5 (Clasificación IgD/CD38)**



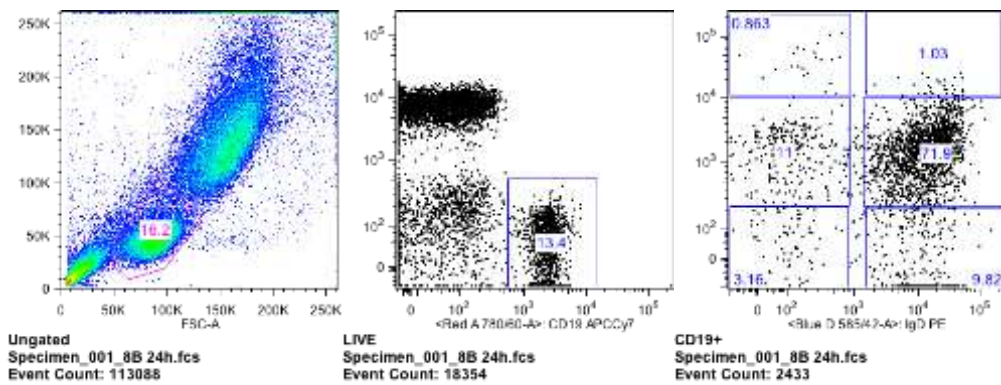
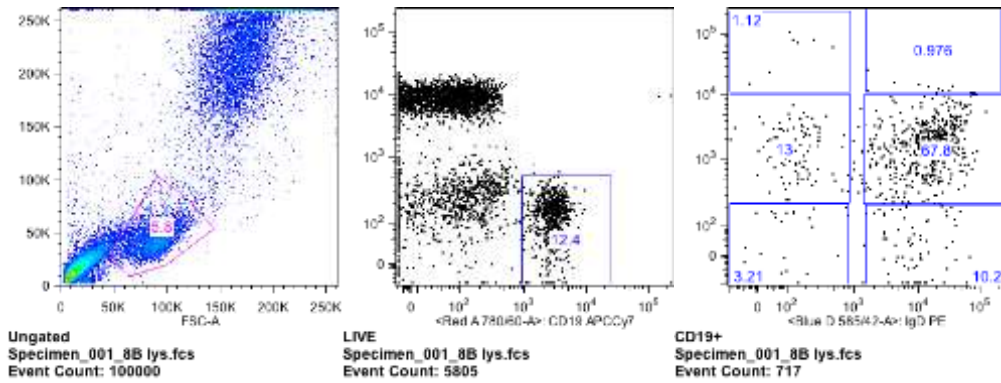
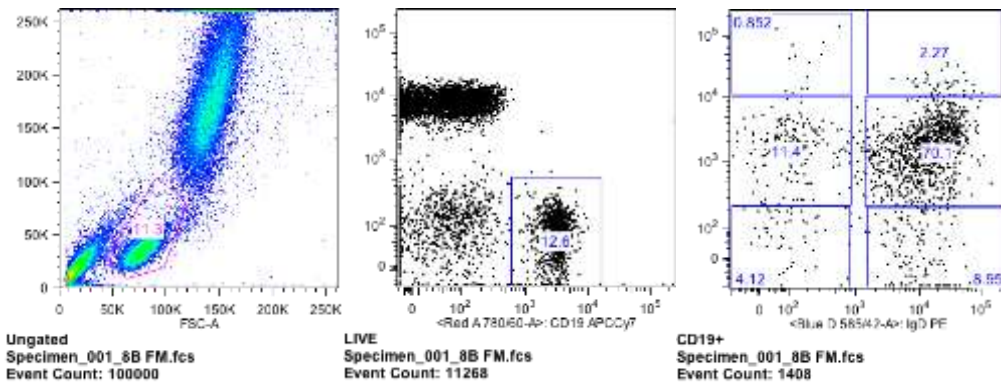
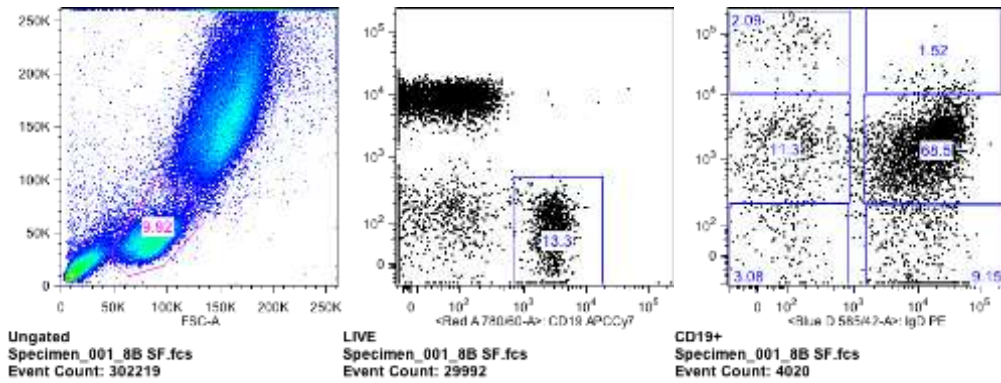
**SUJETO 6 (Clasificación IgD/CD38)**



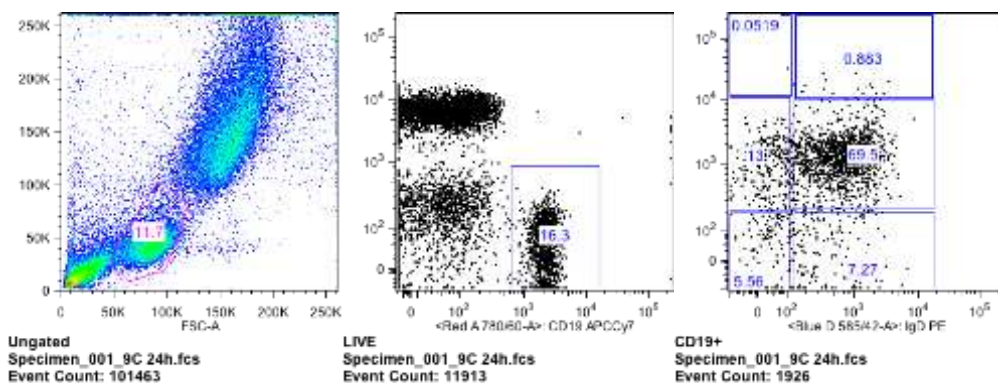
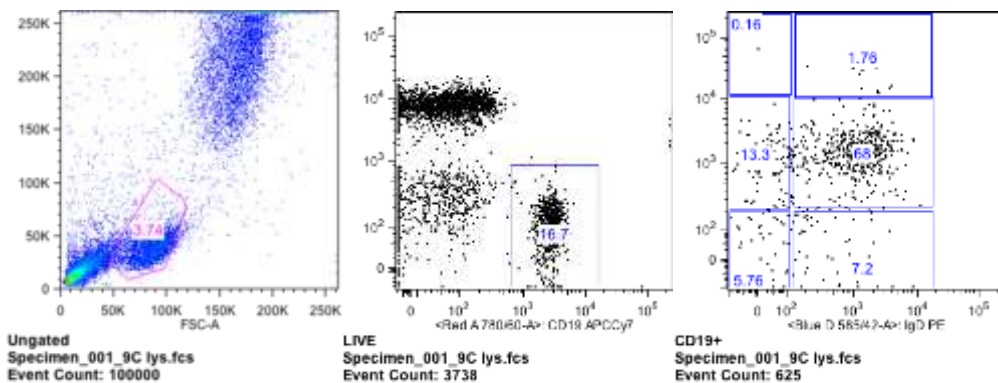
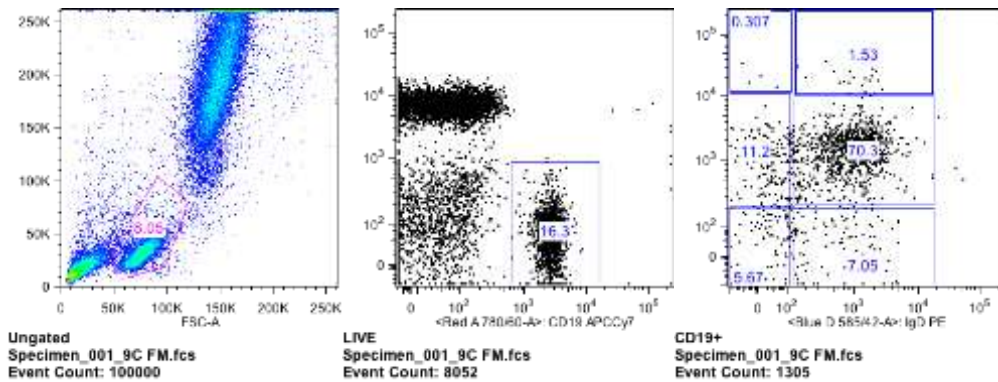
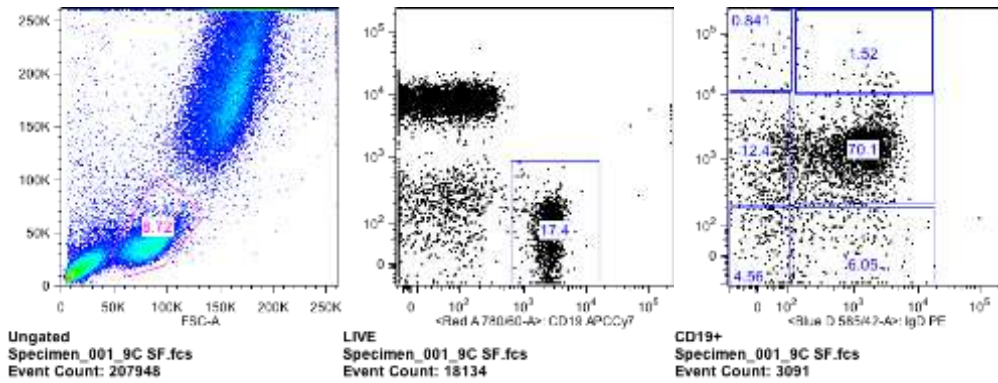
**SUJETO 7 (Clasificación IgD/CD38)**



**SUJETO 8 (Clasificación IgD/CD38)**

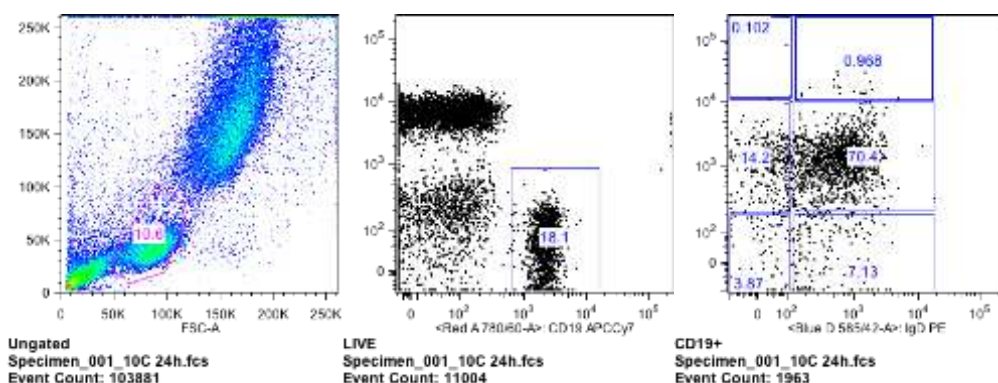
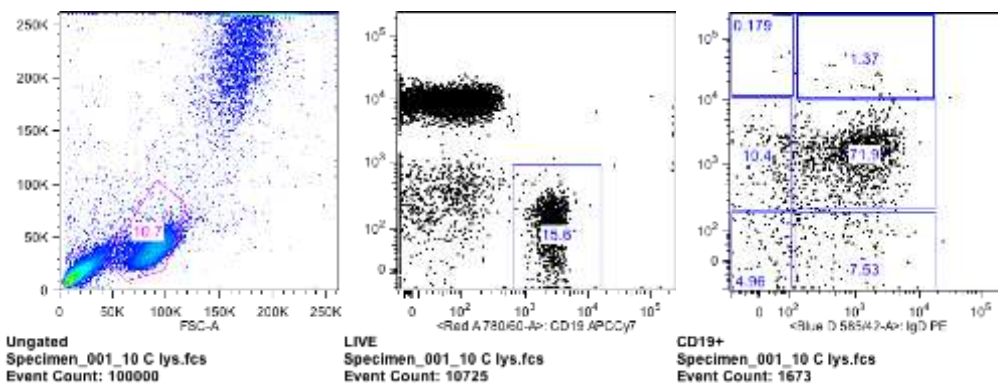
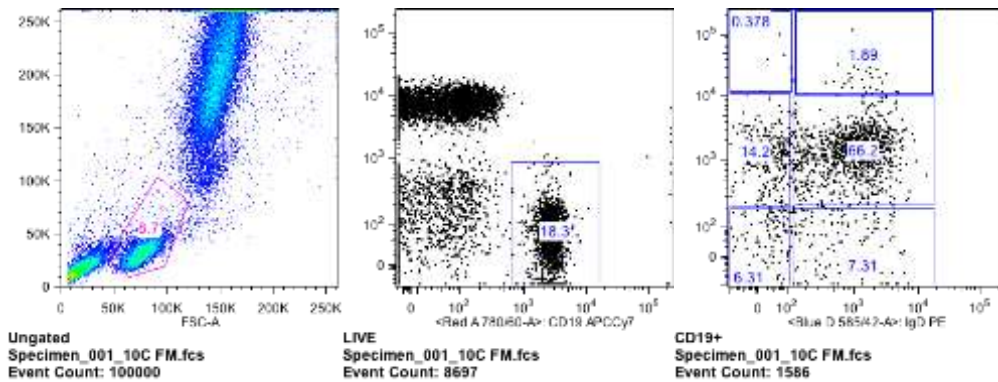
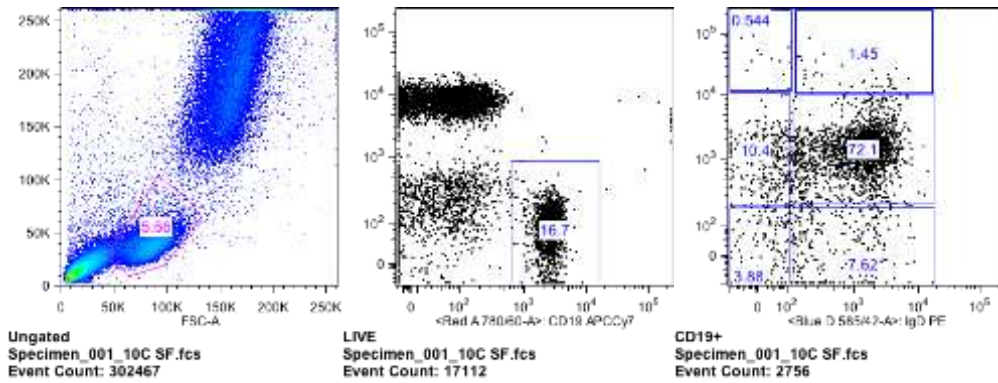


**SUJETO 9 (Clasificación IgD/CD38)**

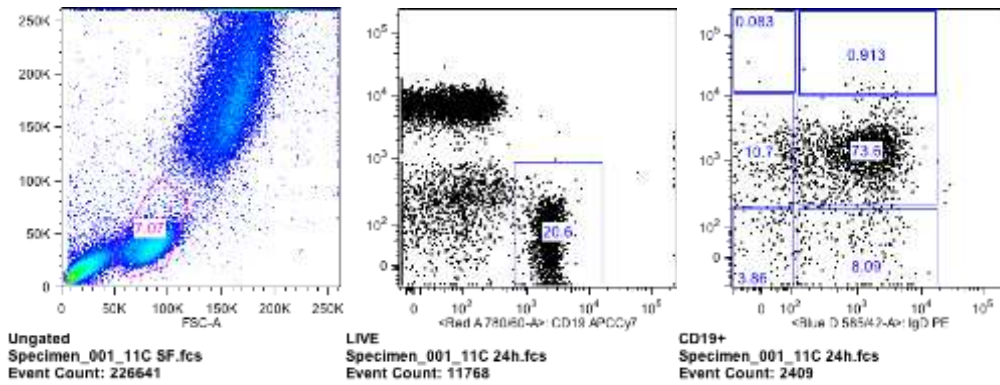
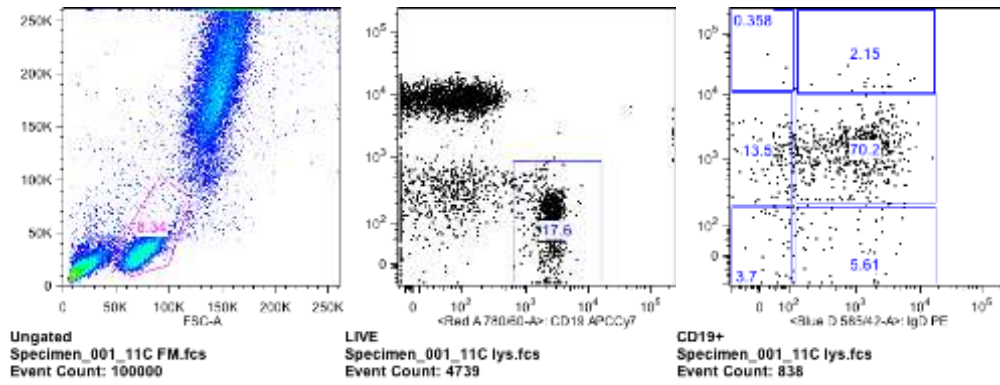
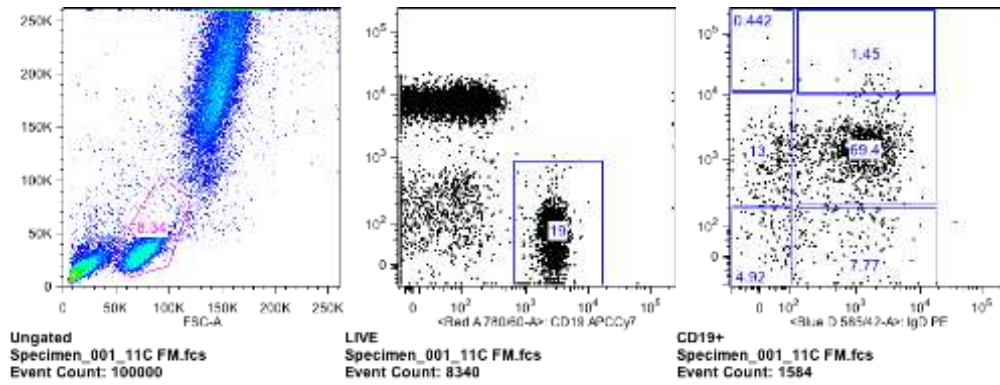
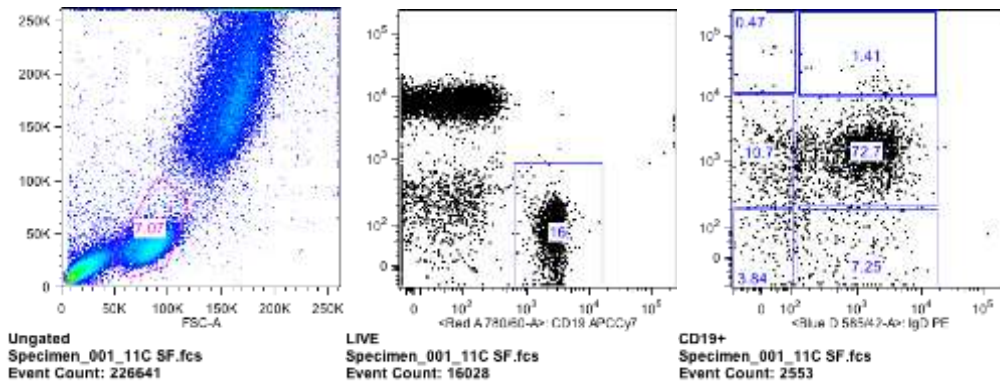




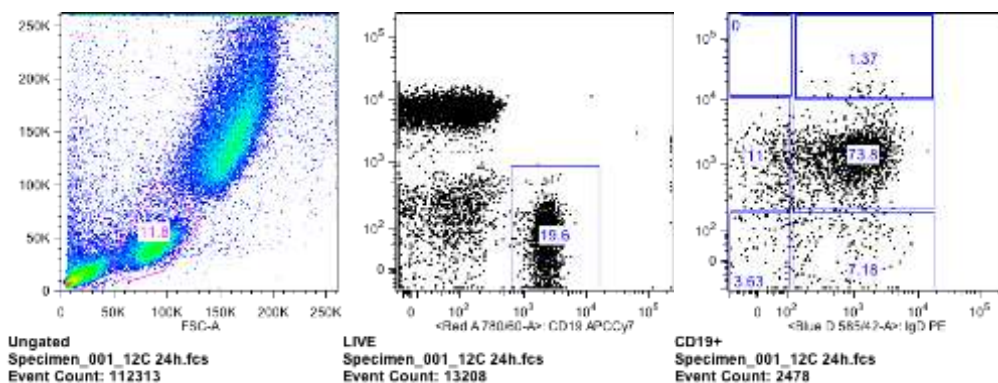
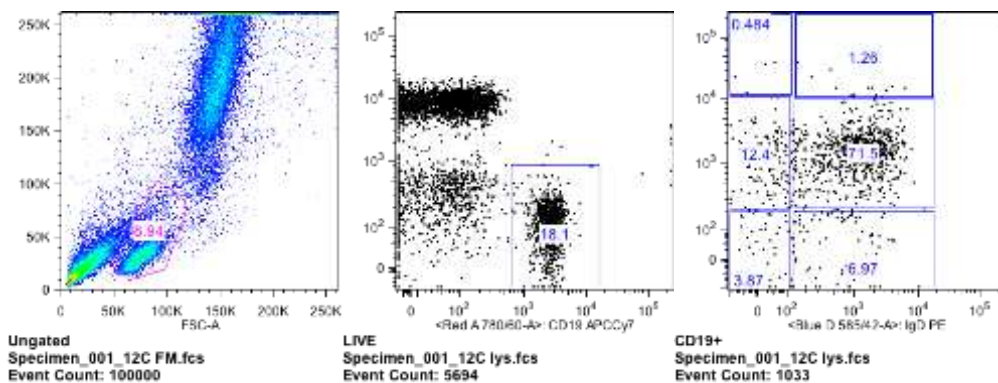
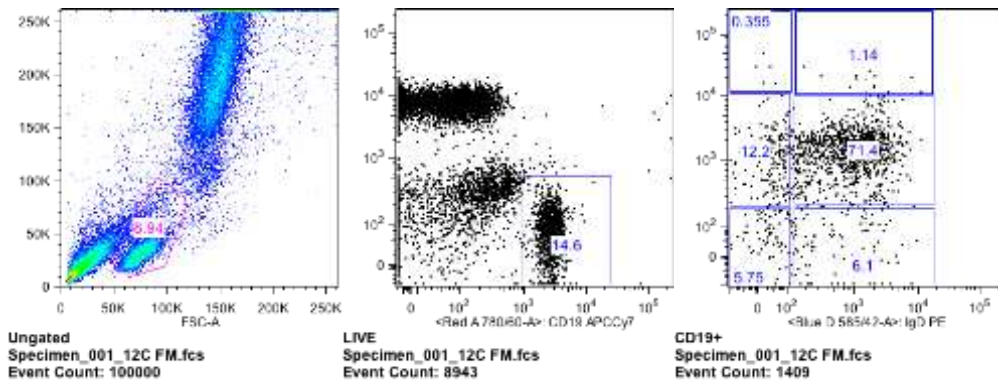
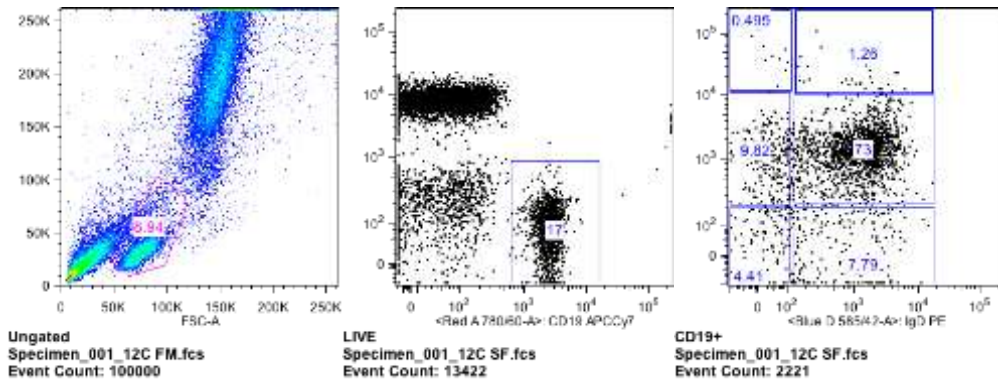
**SUJETO 10 (Clasificación IgD/CD38)**



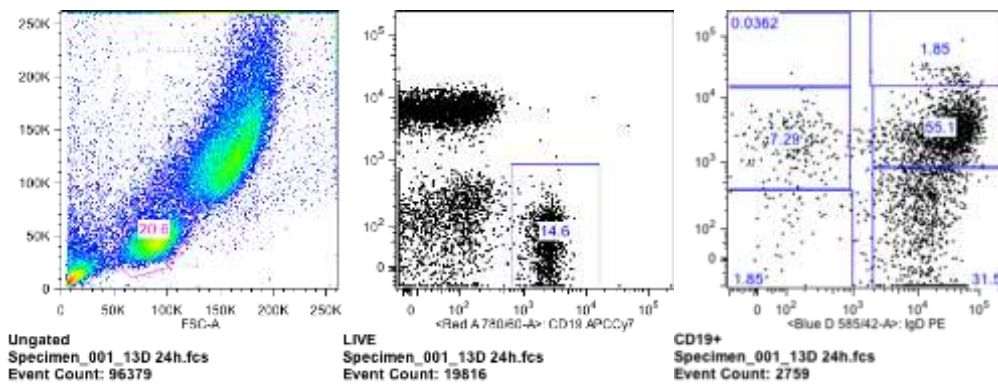
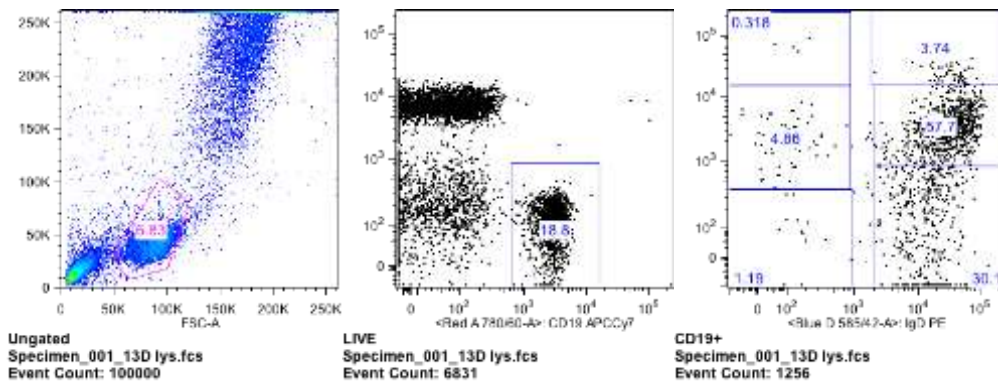
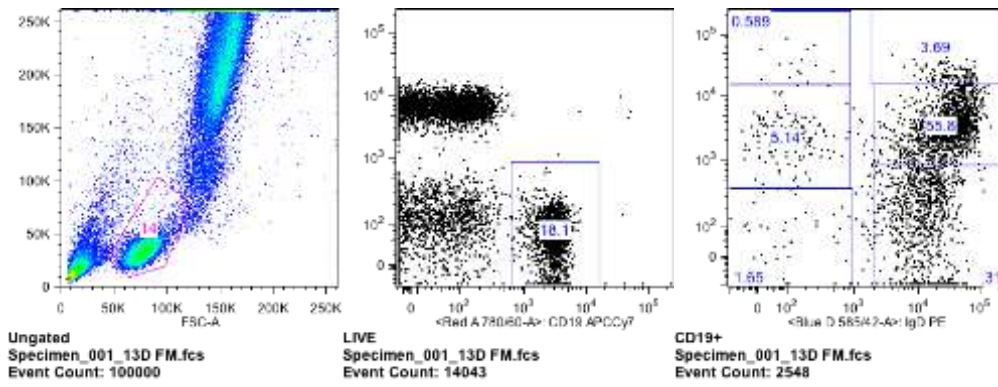
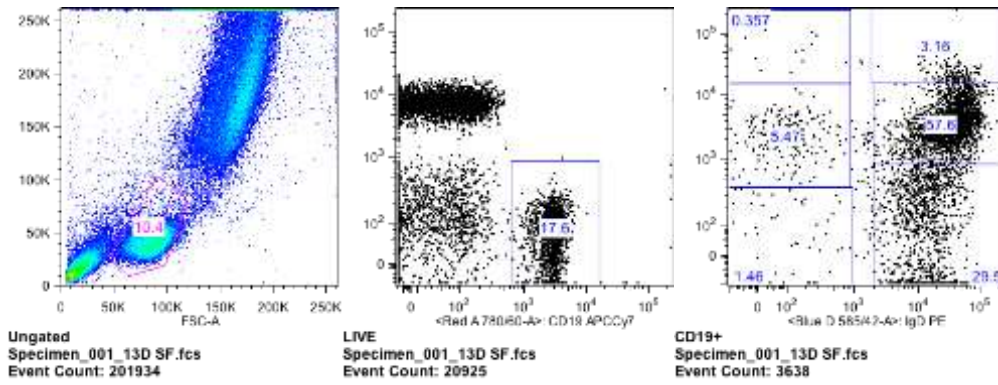
**SUJETO 11 (Clasificación IgD/CD38)**



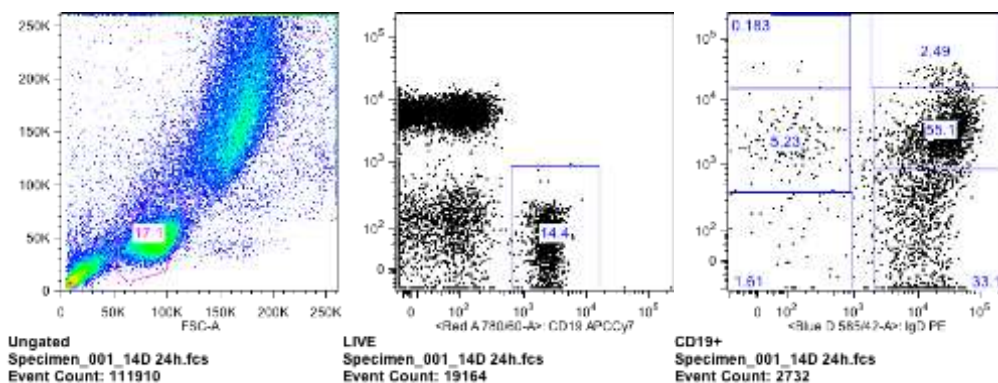
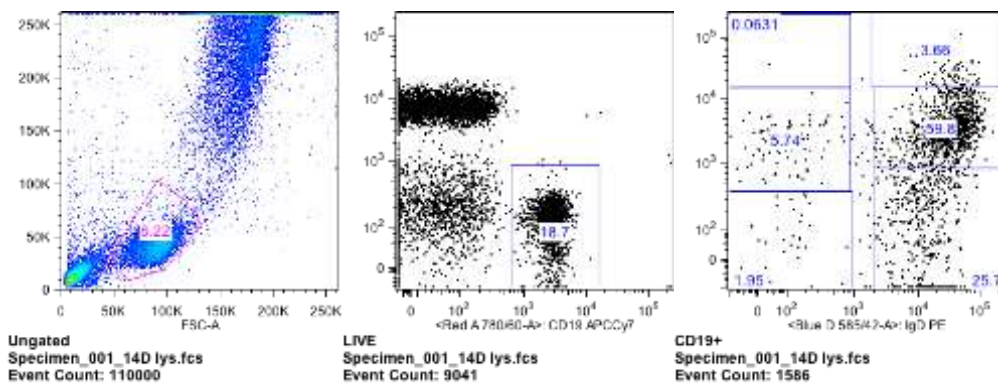
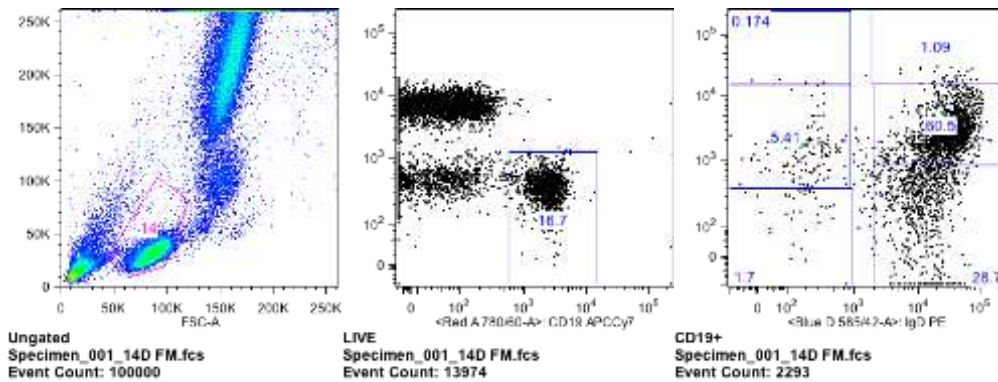
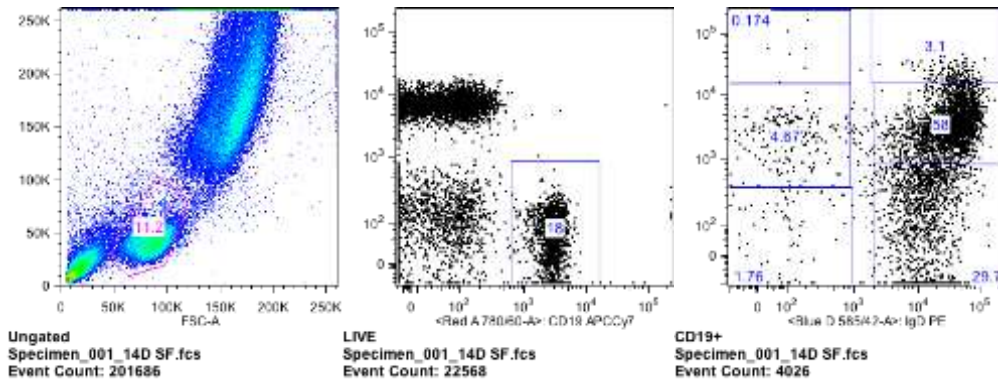
**SUJETO 12 (Clasificación IgD/CD38)**



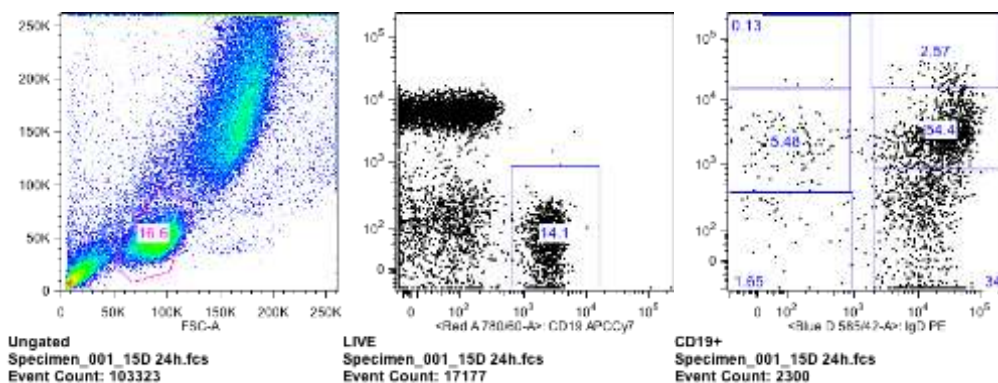
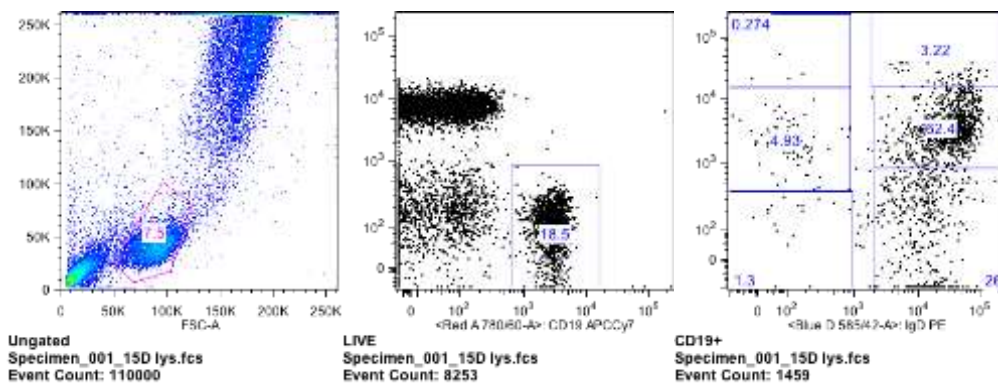
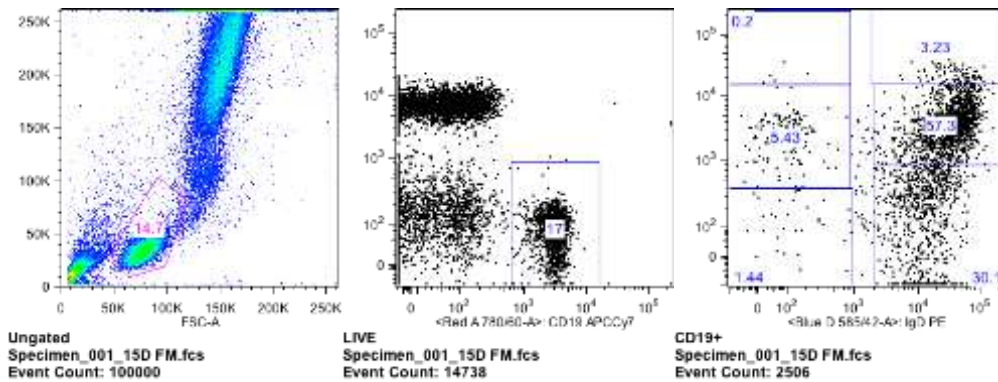
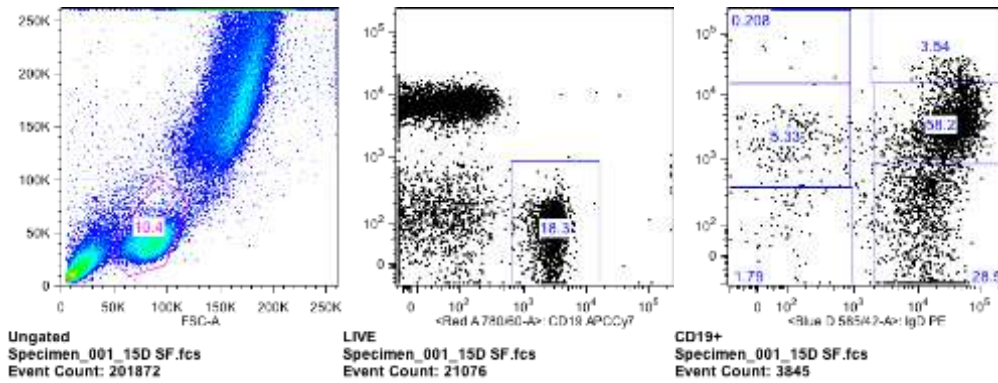
**SUJETO 13 (Clasificación IgD/CD38)**



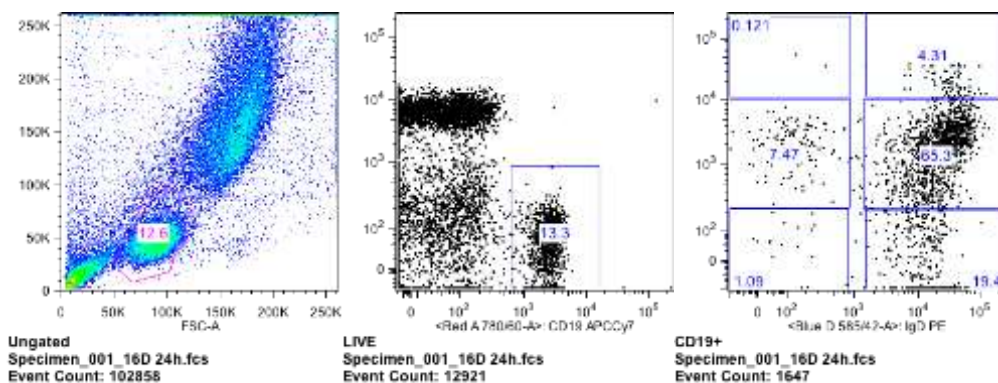
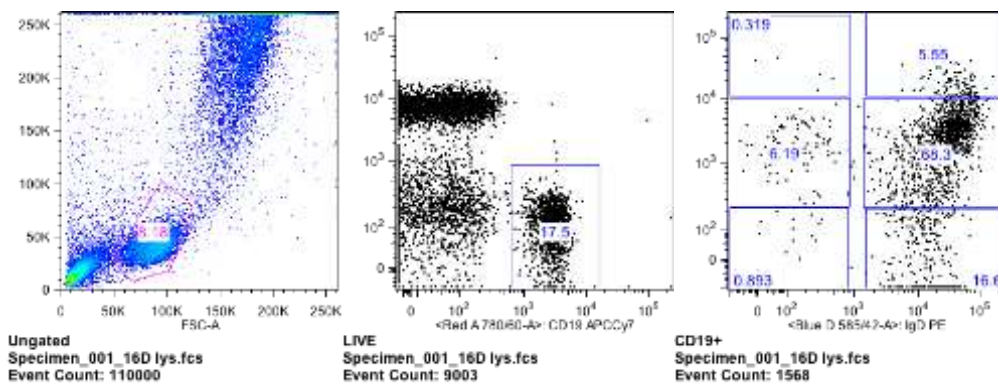
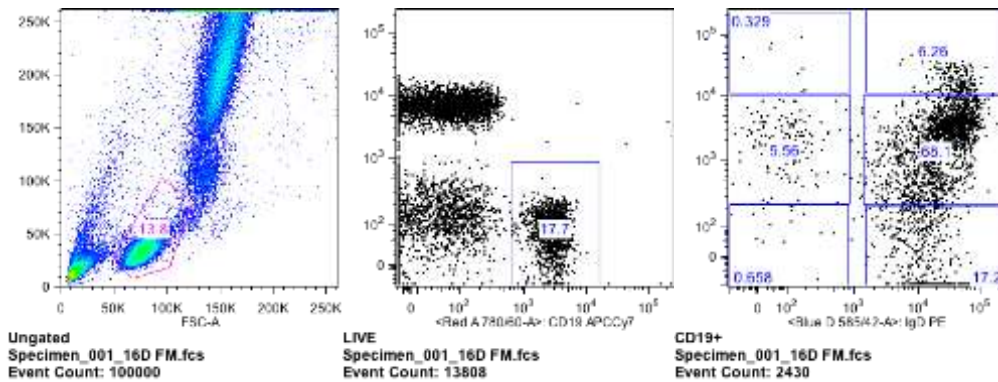
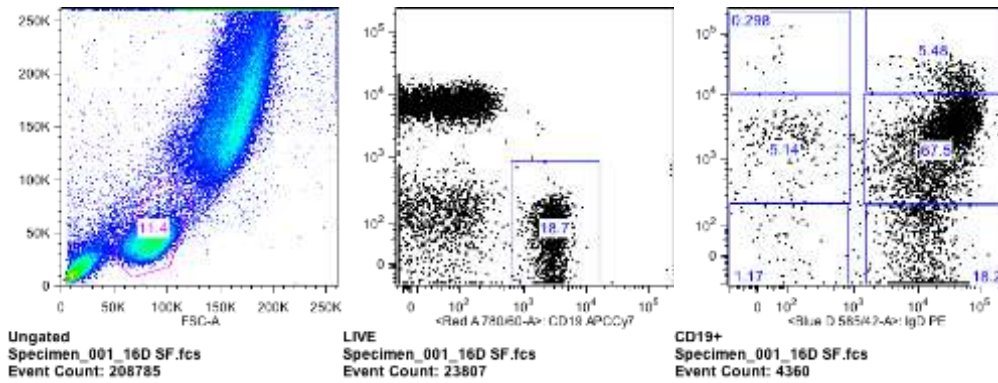
**SUJETO 14 (Clasificación IgD/CD38)**



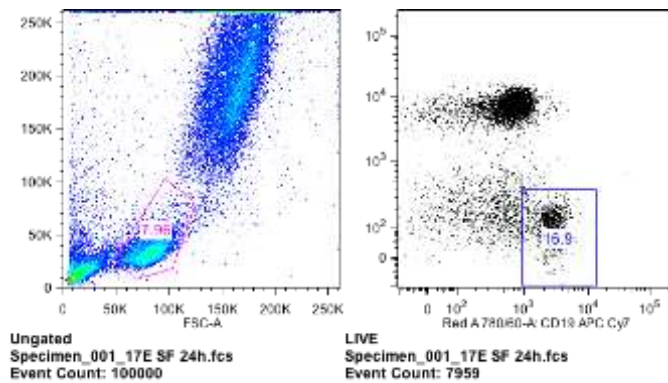
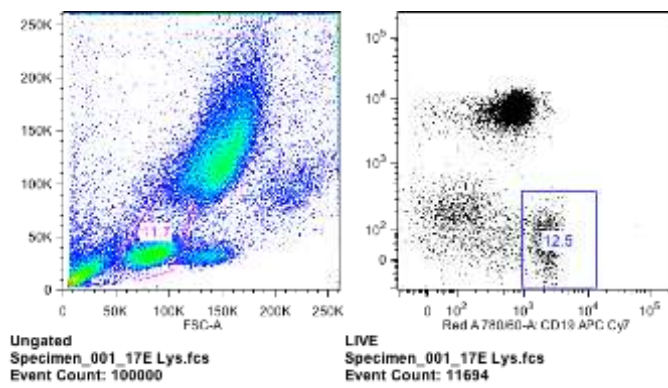
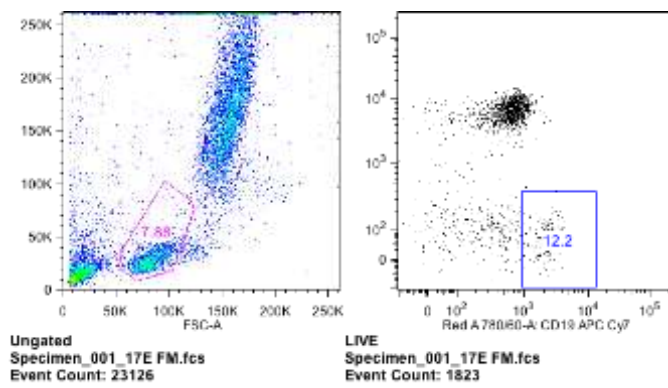
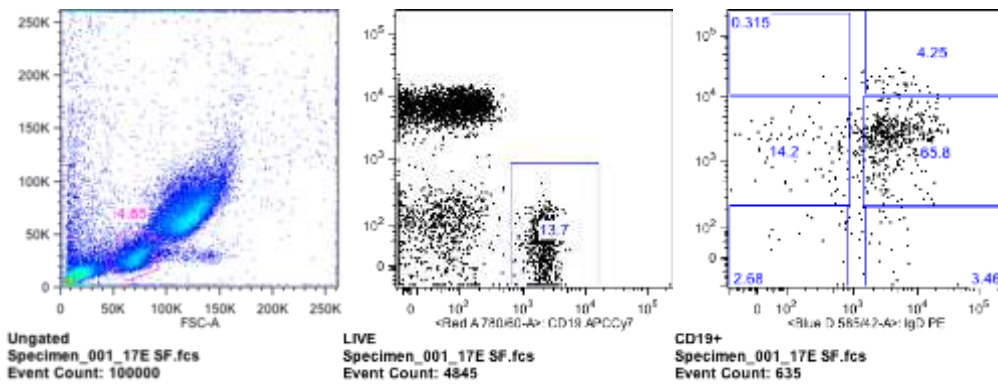
**SUJETO 15 (Clasificación IgD/CD38)**



**SUJETO 16 (Clasificación IgD/CD38)**

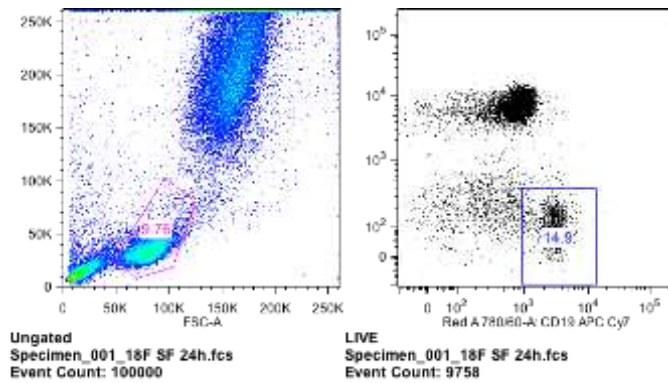
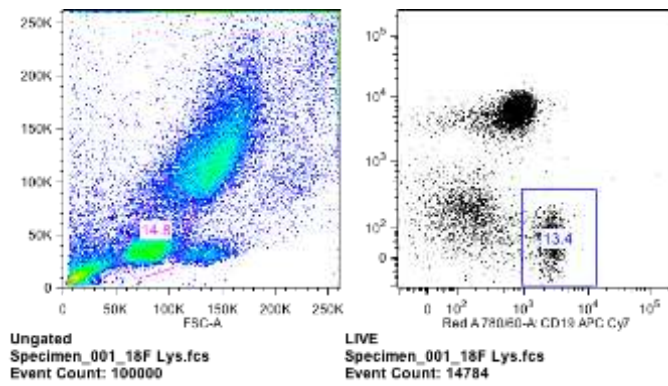
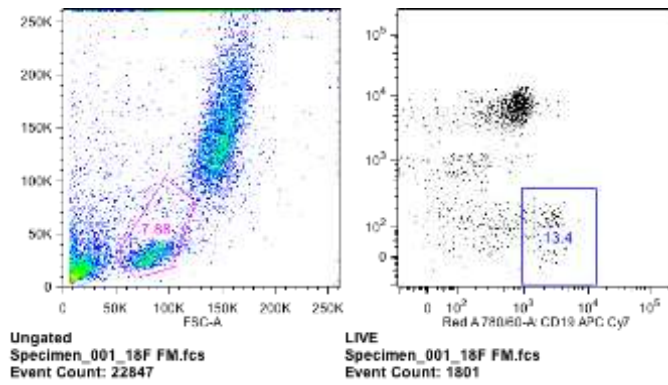
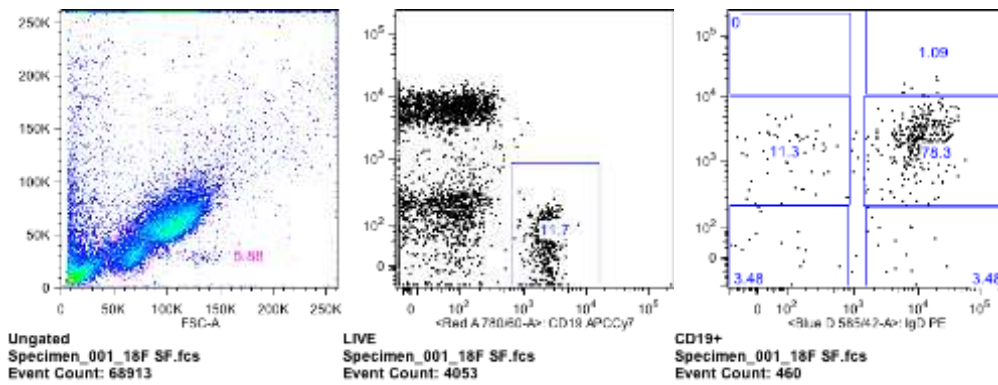


**SUJETO 17 (Clasificación IgD/CD38)**

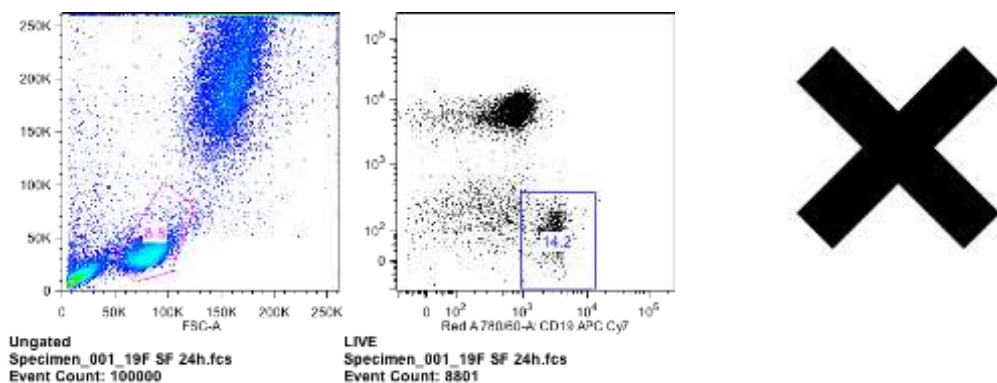
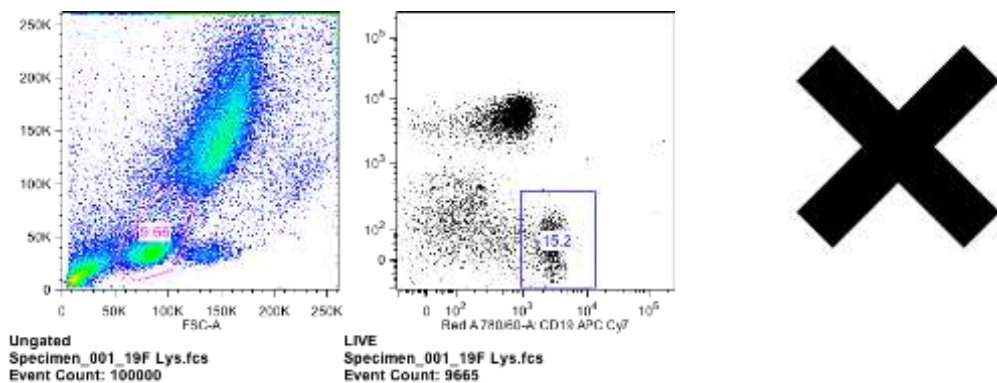
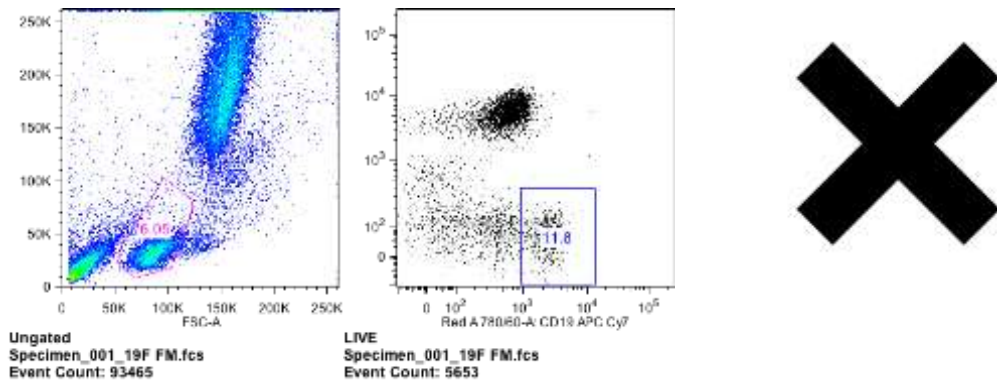
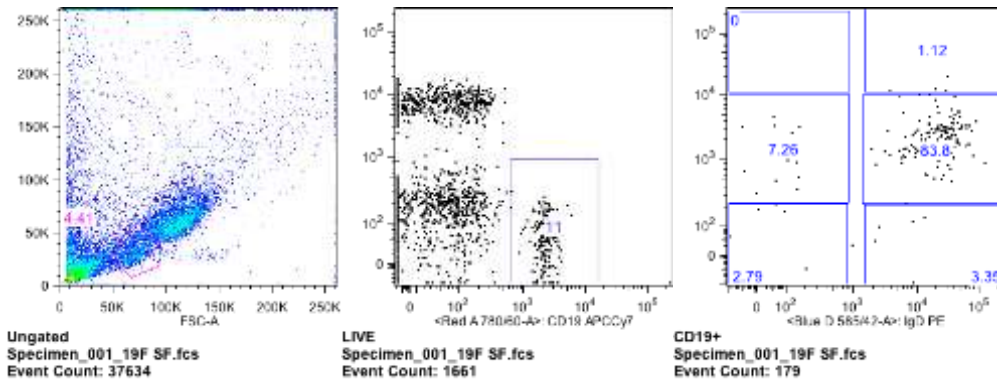




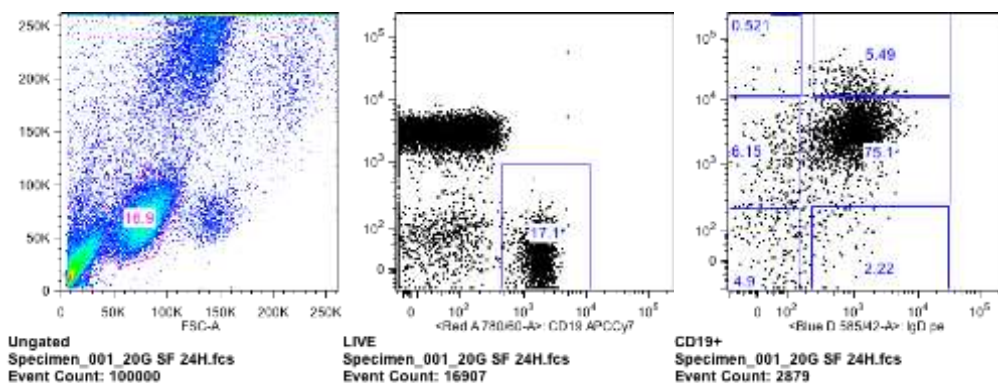
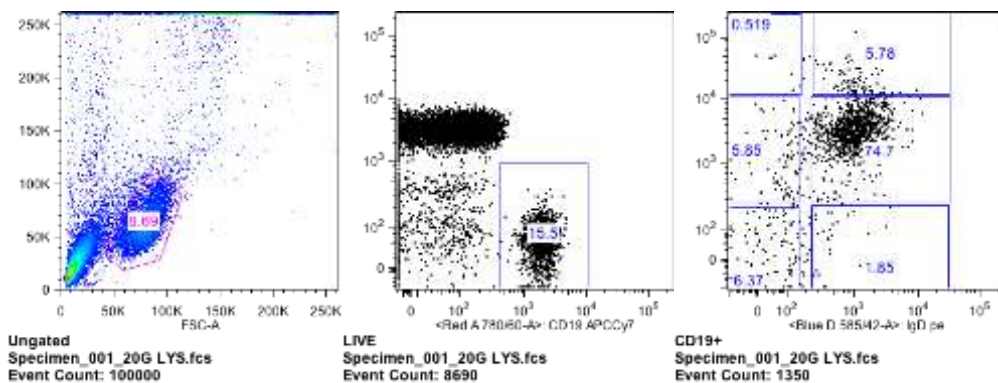
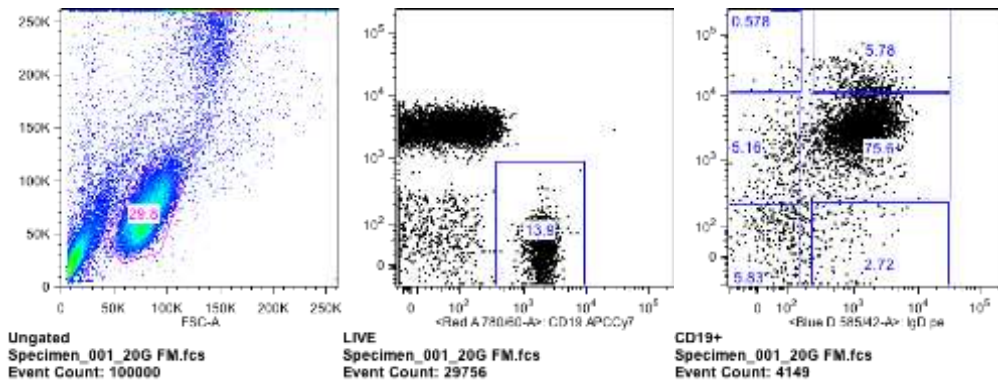
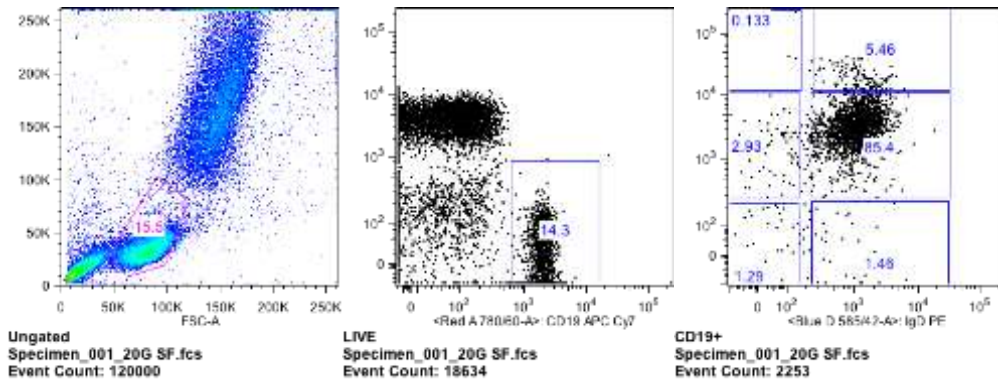
**SUJETO 18 (Clasificación IgD/CD38)**



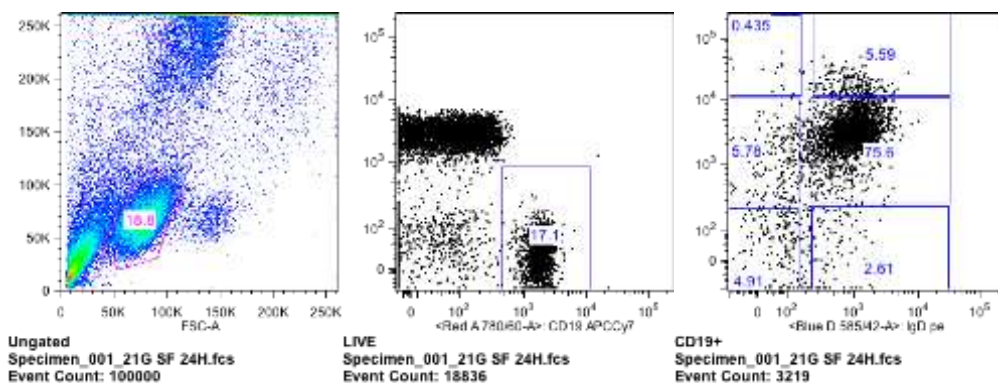
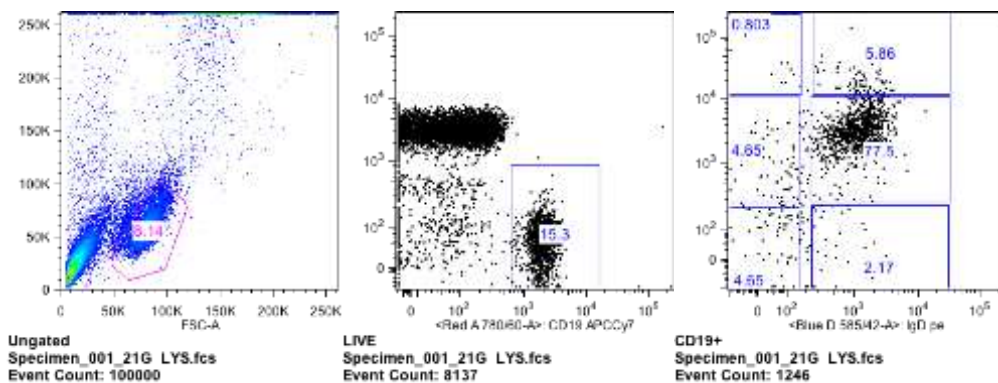
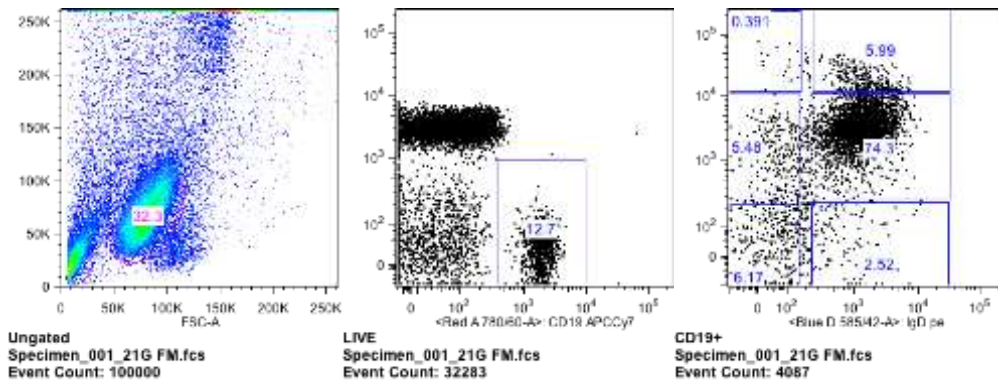
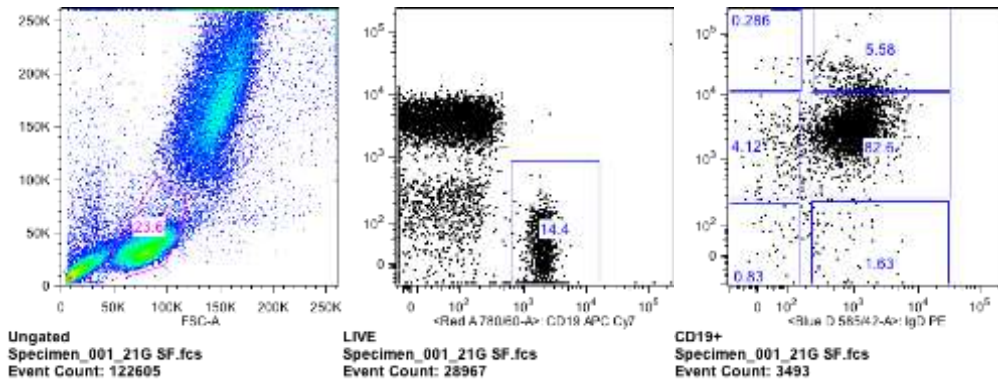
**SUJETO 19 (Clasificación IgD/CD38)**



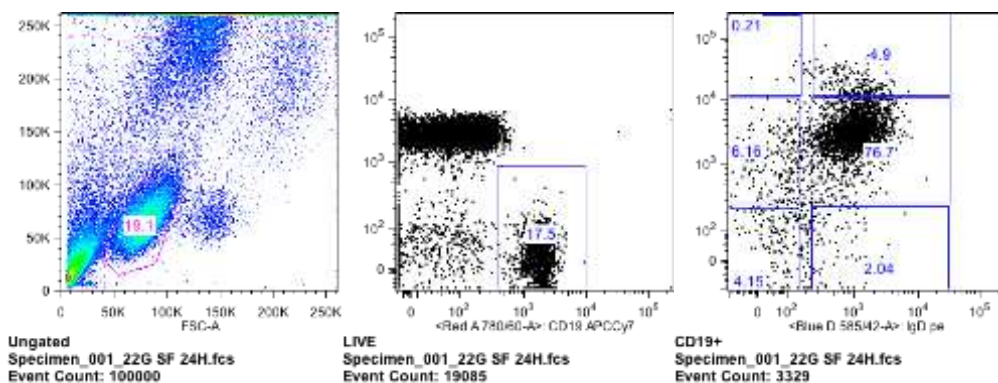
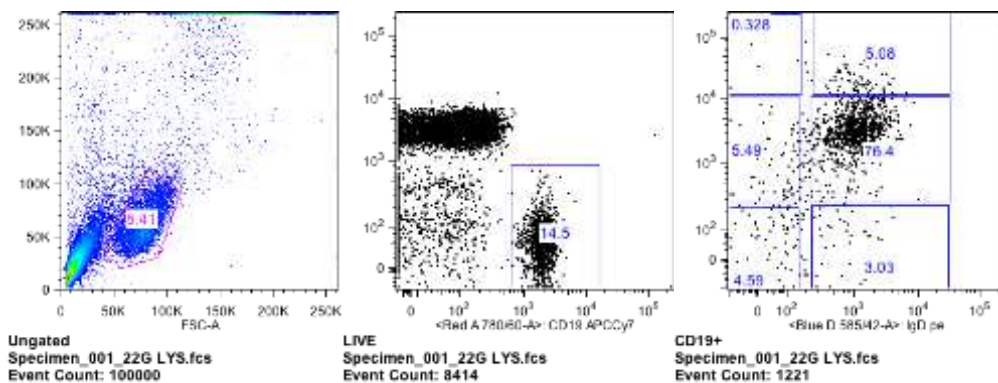
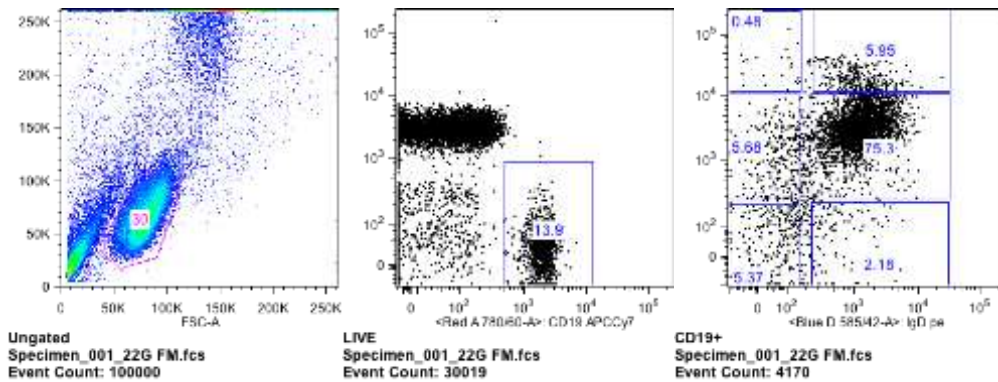
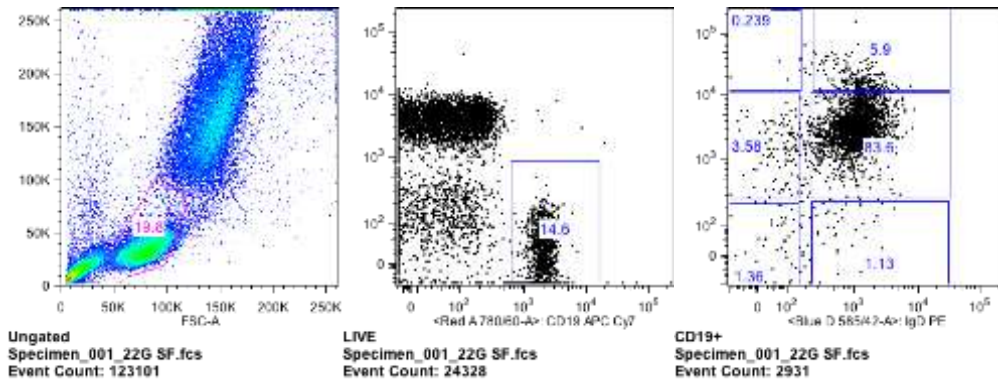
**SUJETO 20 (Clasificación IgD/CD38)**



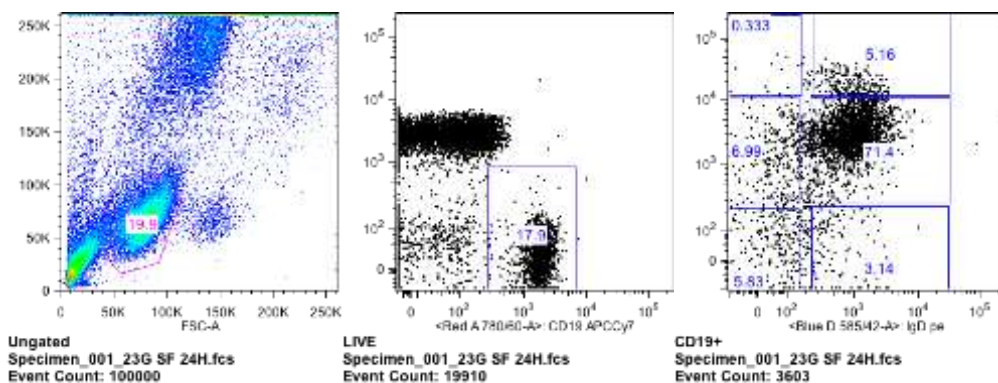
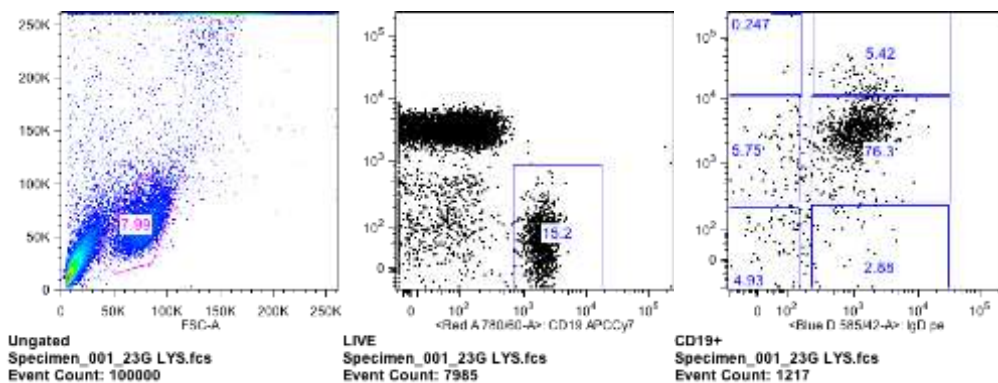
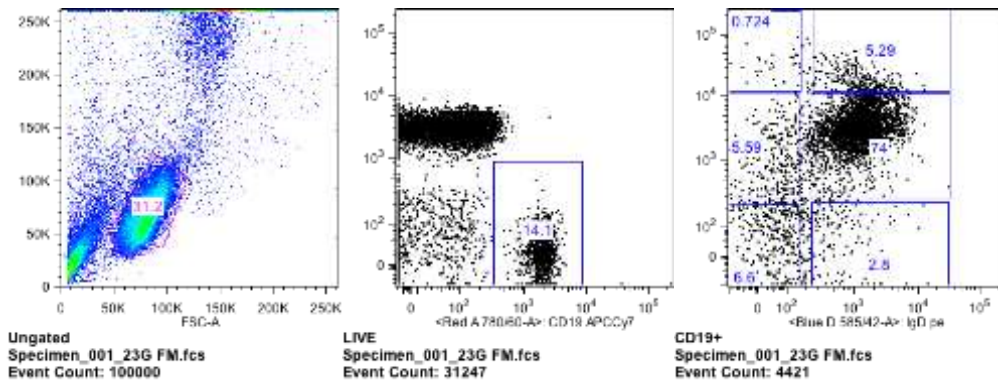
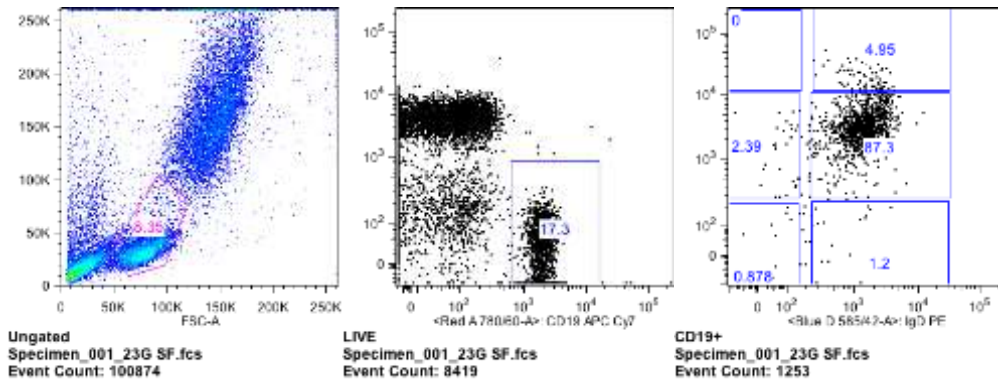
**SUJETO 21 (Clasificación IgD/CD38)**



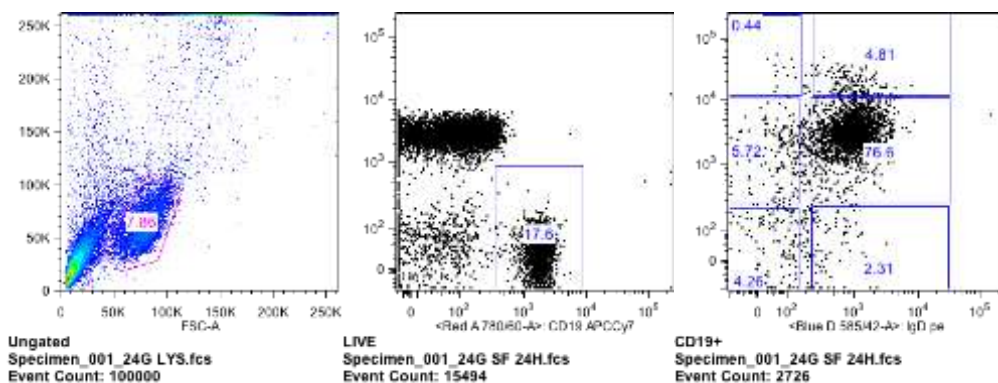
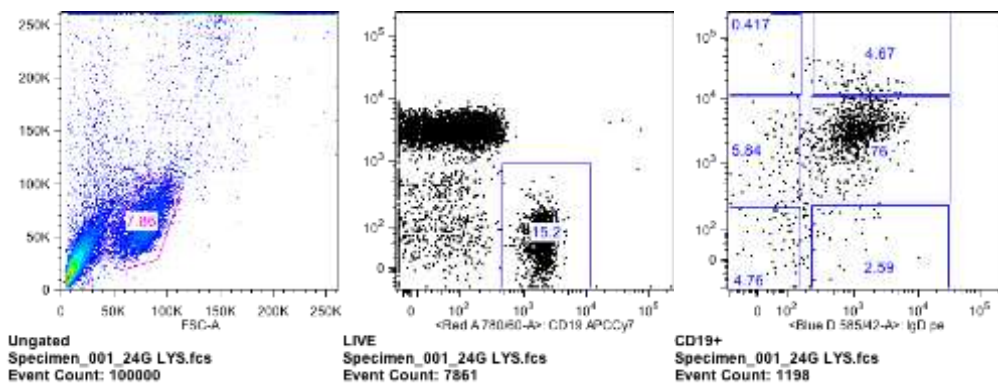
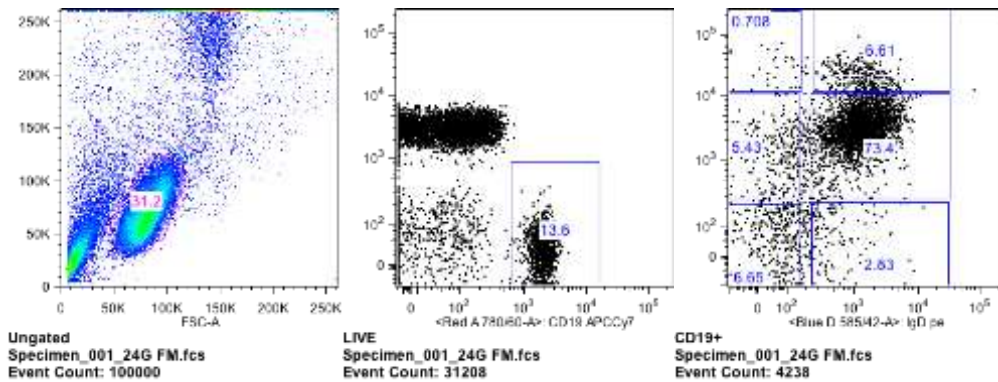
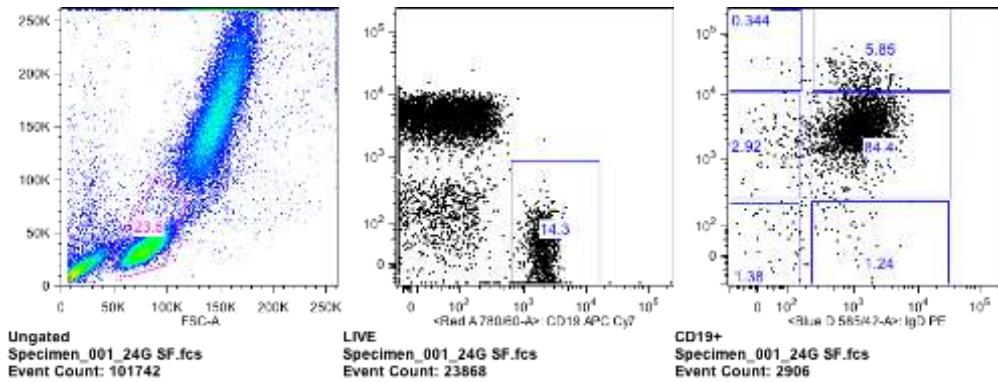
**SUJETO 22 (Clasificación IgD/CD38)**



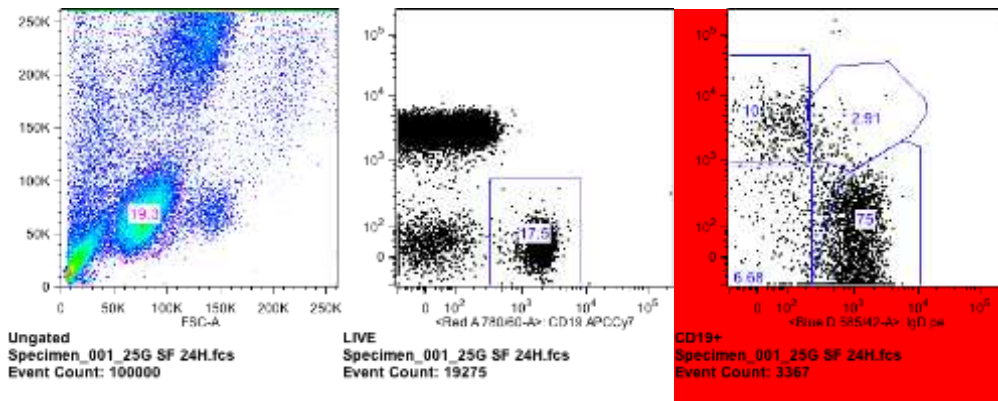
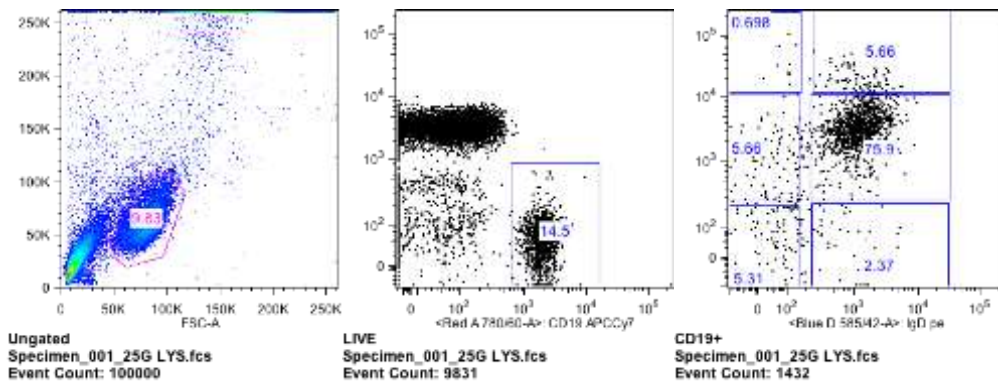
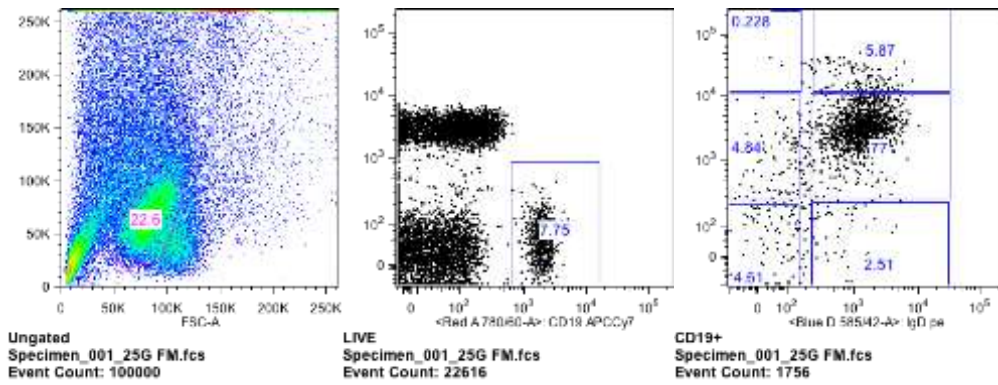
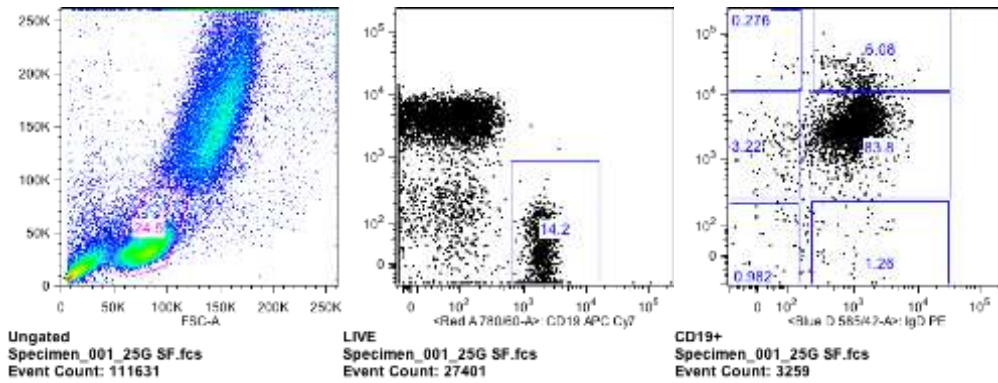
**SUJETO 23 (Clasificación IgD/CD38)**



**SUJETO 24 (Clasificación IgD/CD38)**

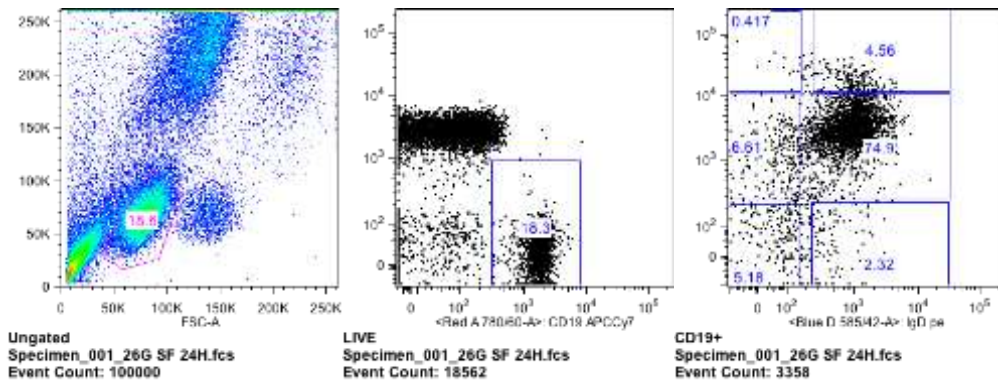
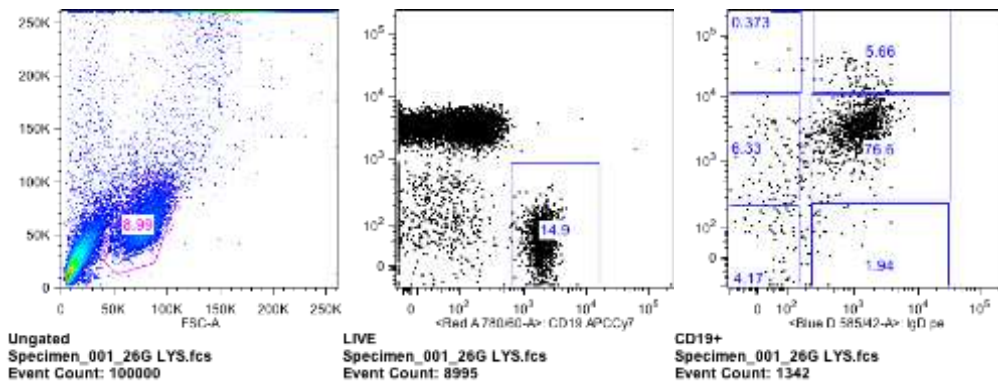
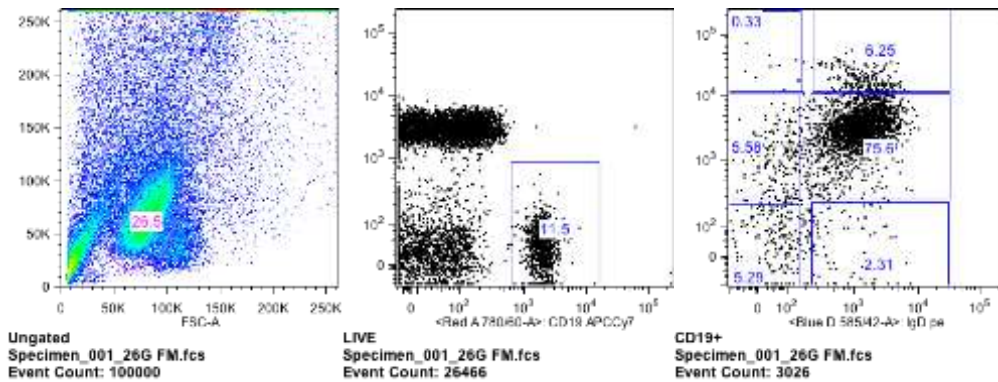
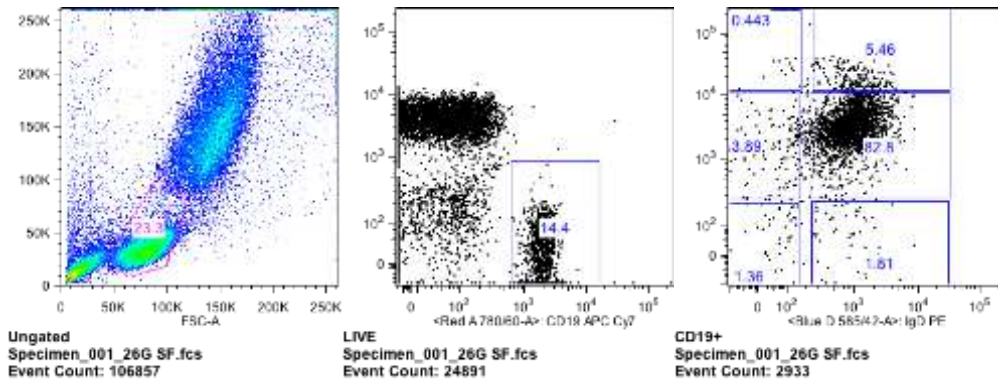


**SUJETO 25 (Clasificación IgD/CD38)**

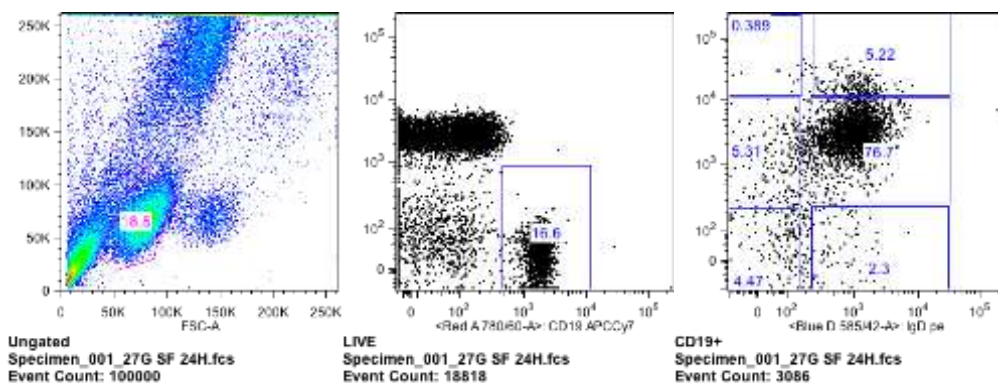
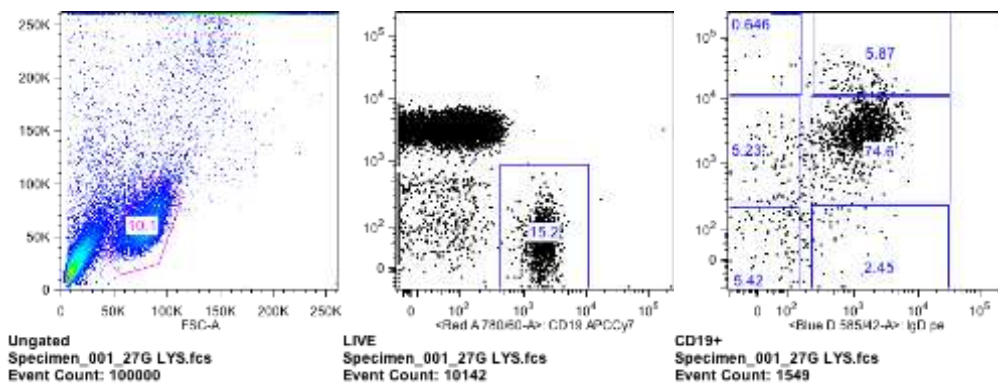
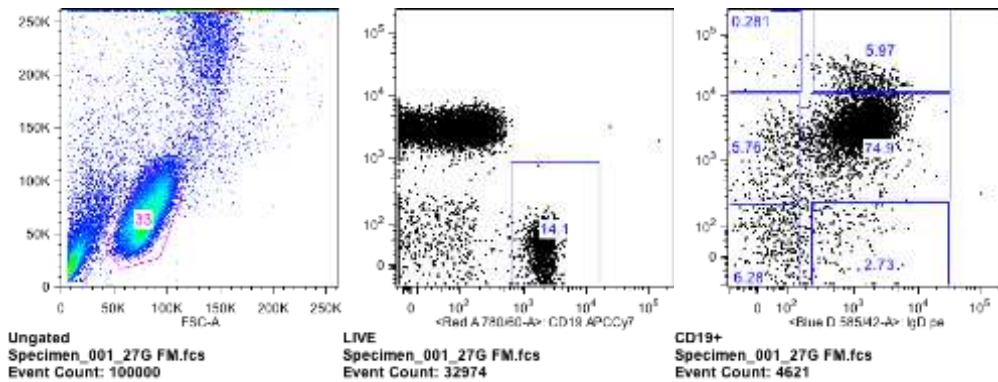
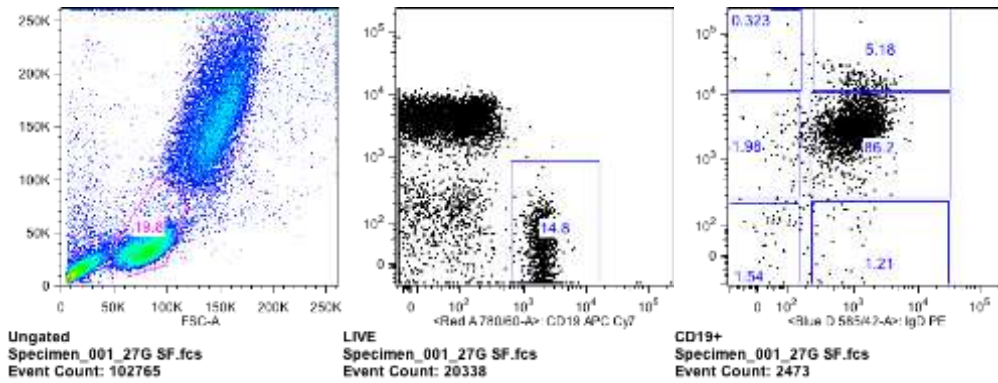




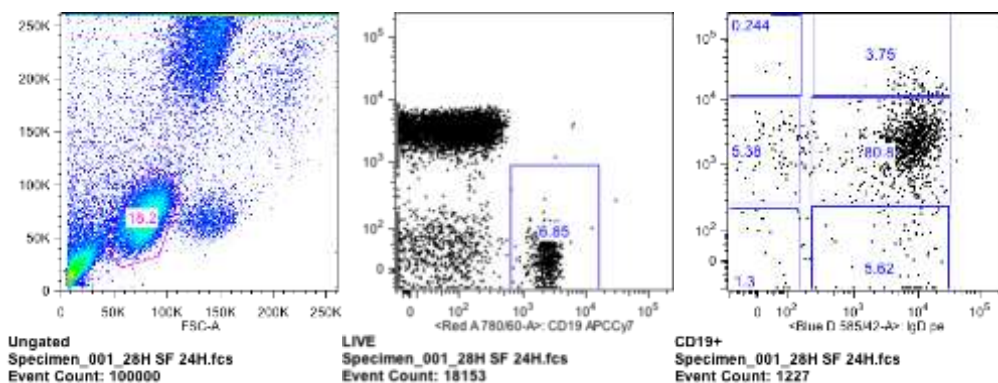
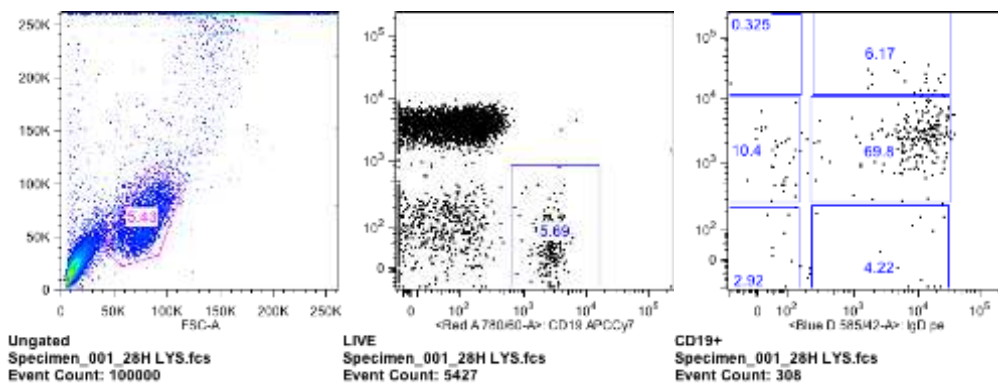
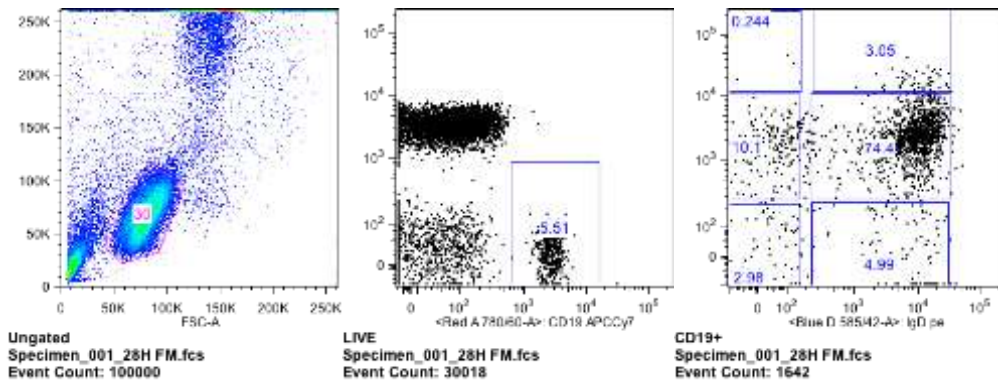
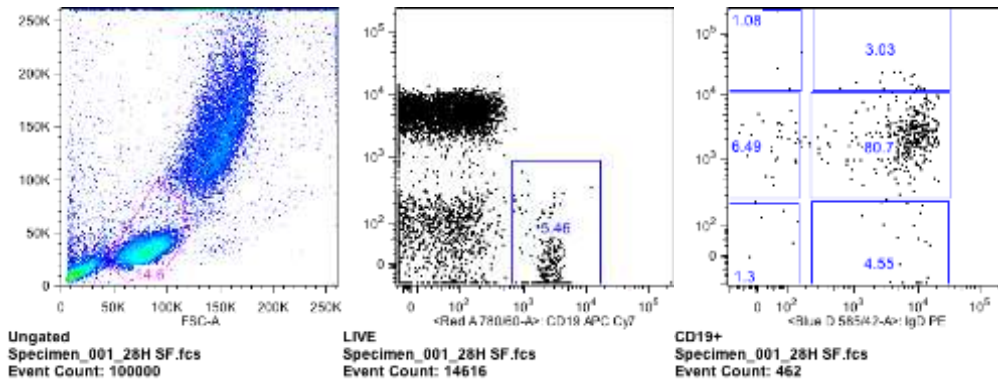
**SUJETO 26 (Clasificación IgD/CD38)**



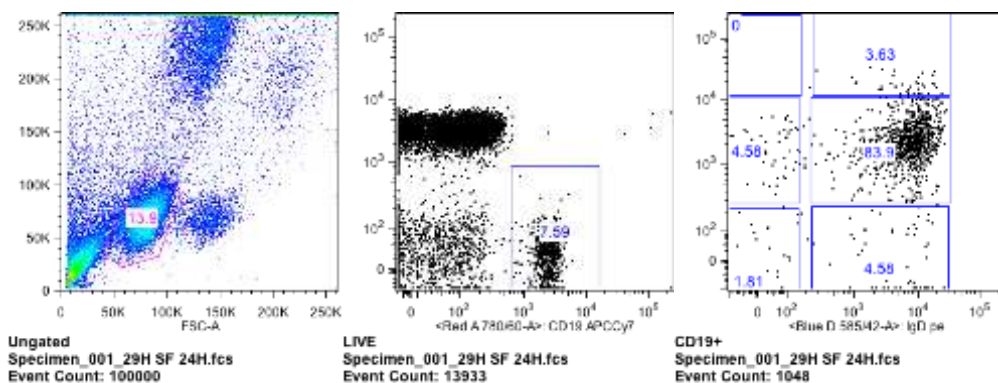
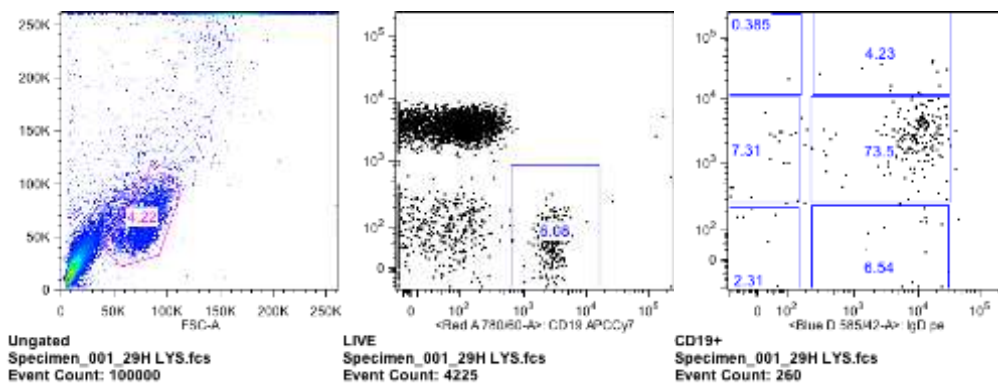
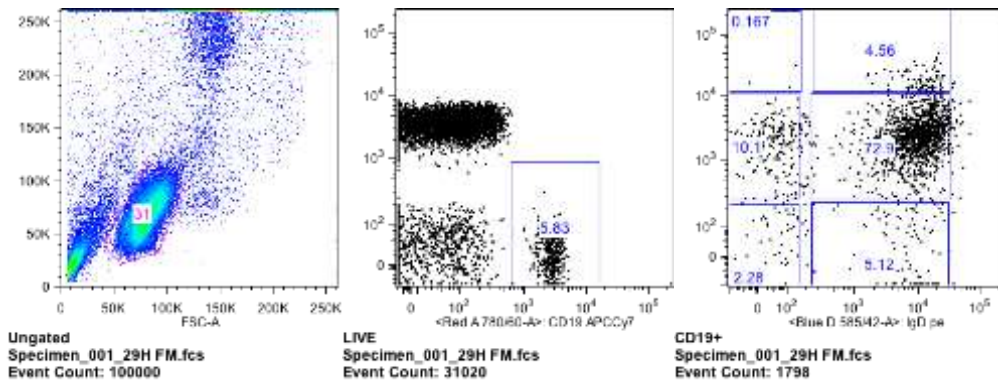
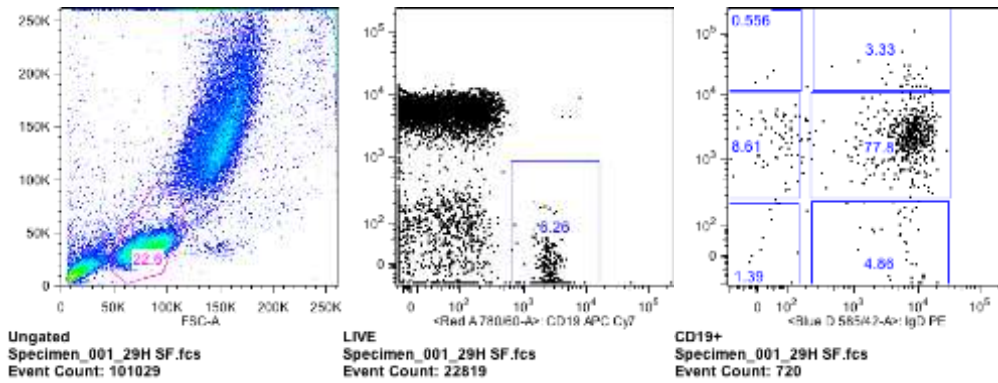
**SUJETO 27 (Clasificación IgD/CD38)**



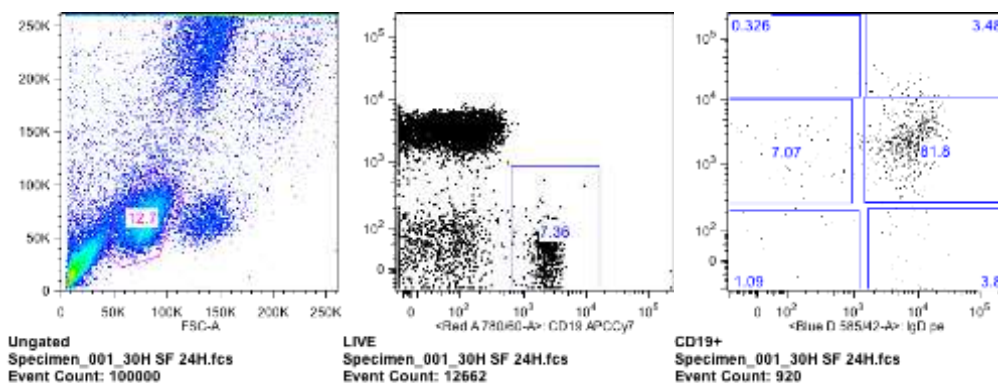
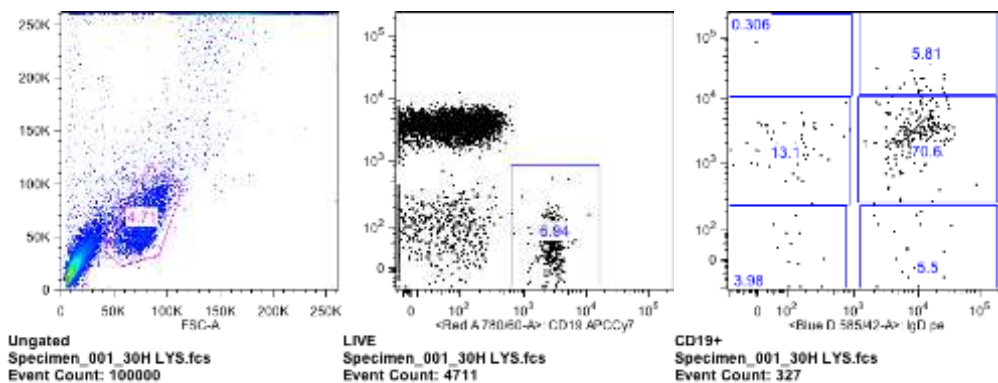
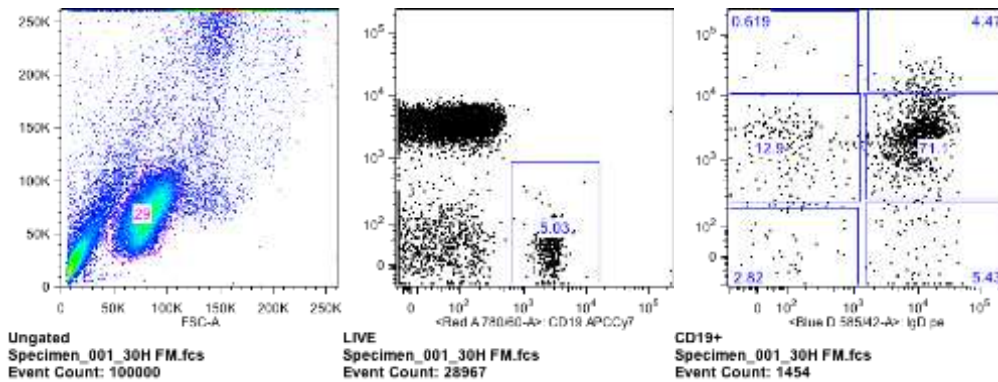
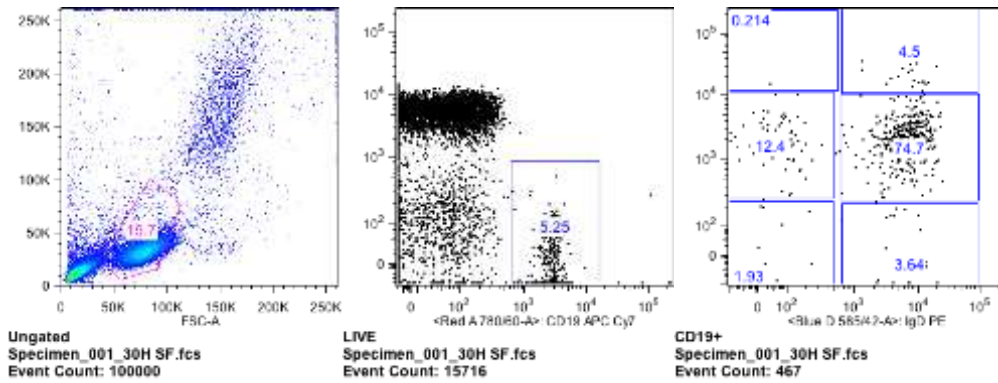
**SUJETO 28 (Clasificación IgD/CD38)**



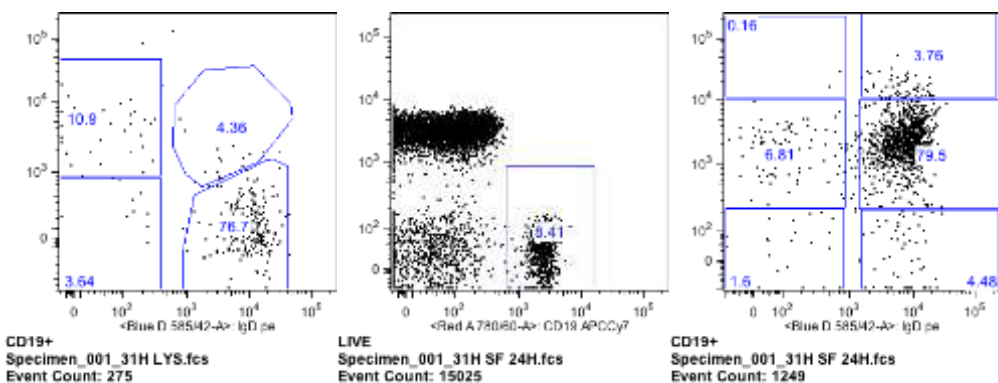
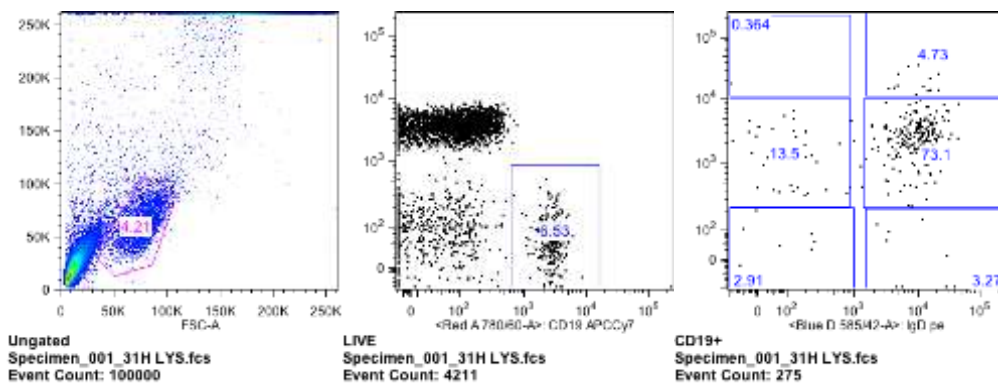
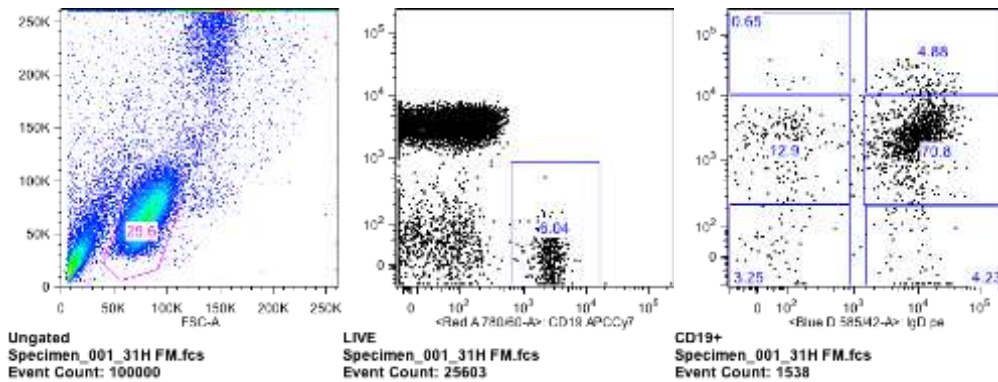
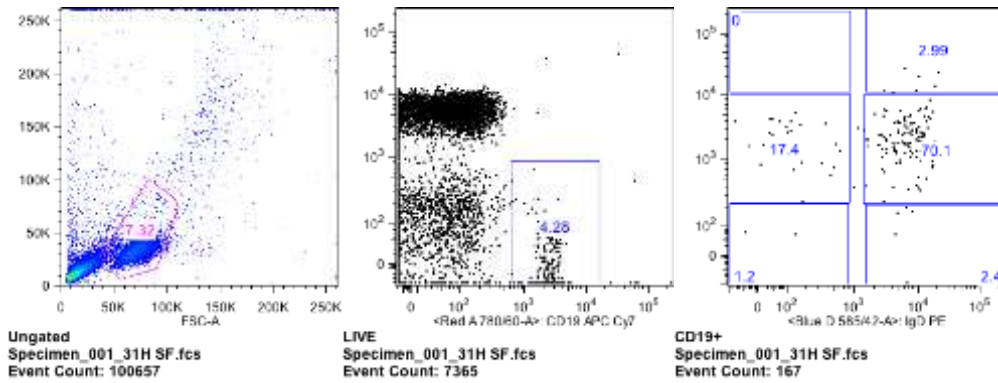
**SUJETO 29 (Clasificación IgD/CD38)**



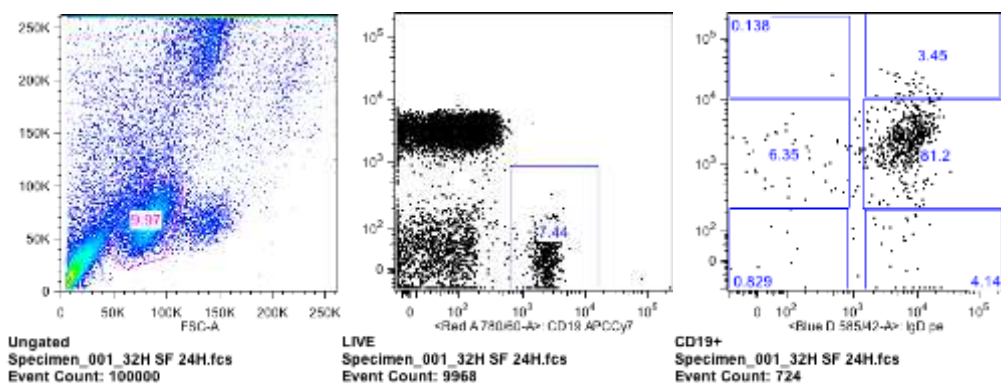
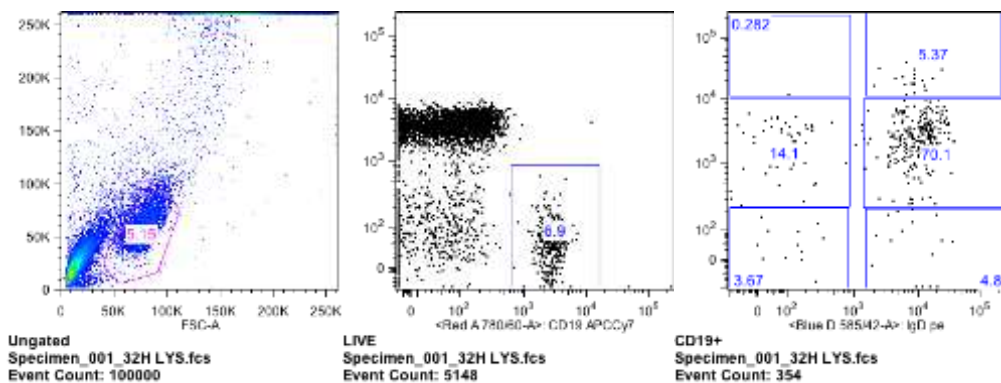
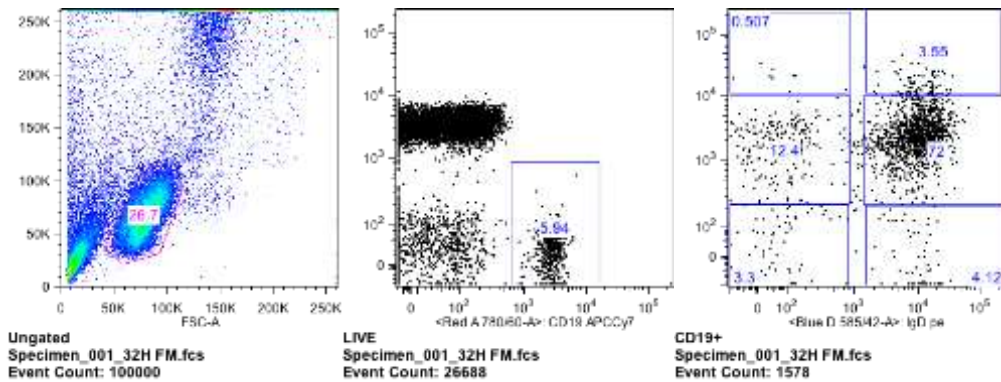
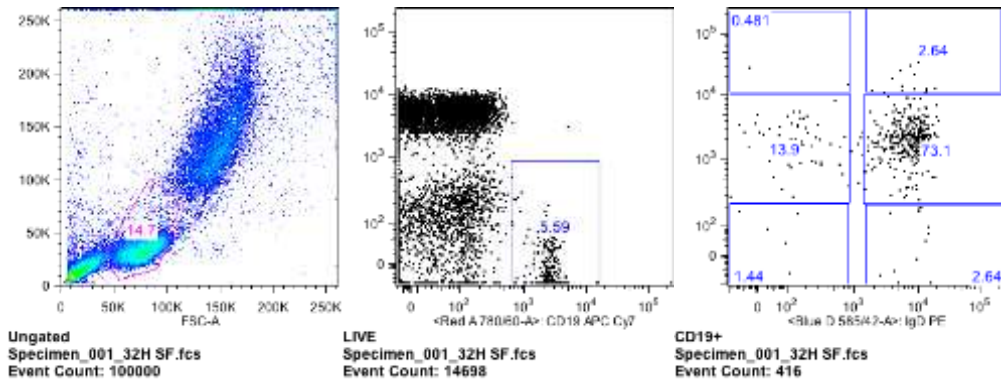
**SUJETO 30 (Clasificación IgD/CD38)**



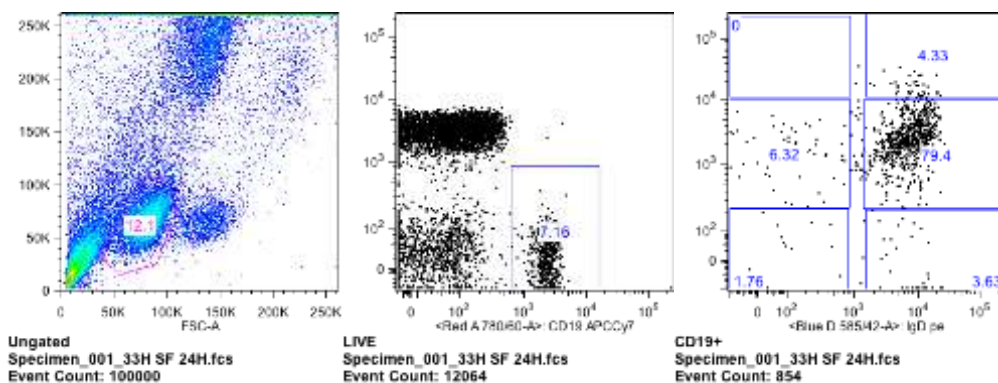
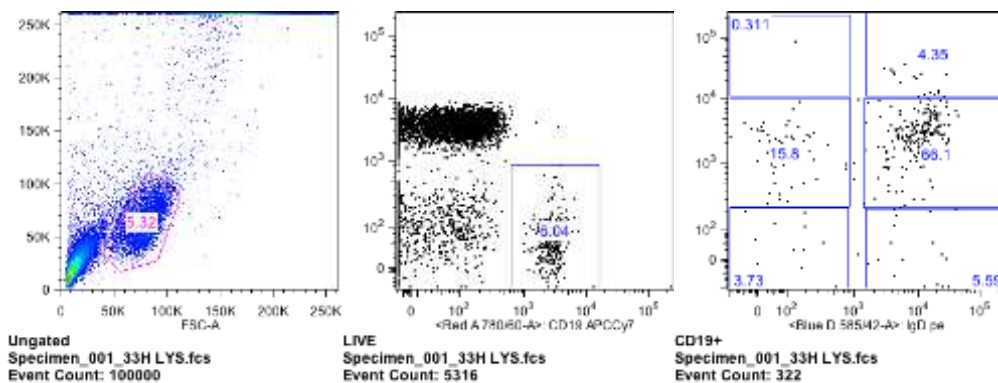
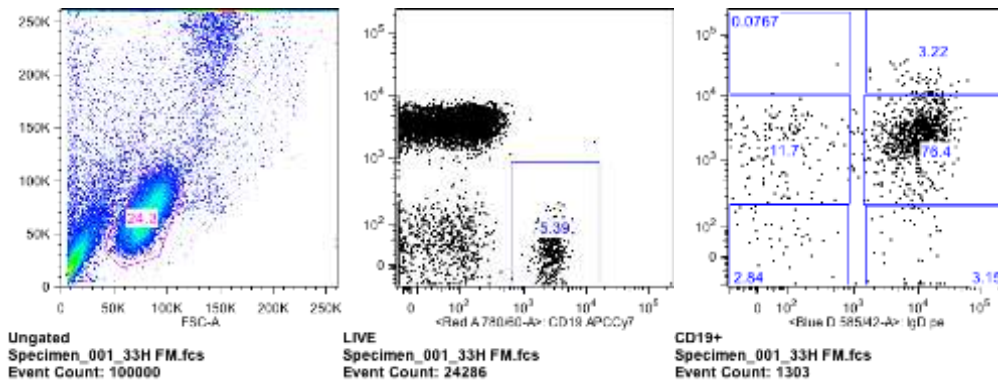
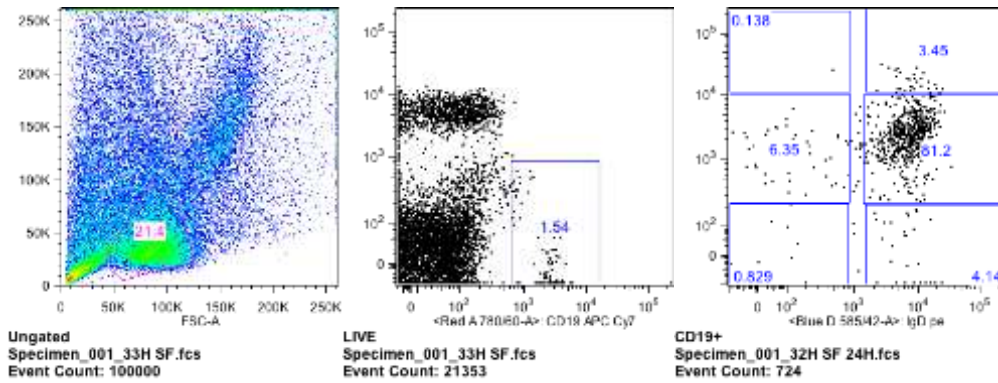
**SUJETO 31 (Clasificación IgD/CD38)**



**SUJETO 32 (Clasificación IgD/CD38)**

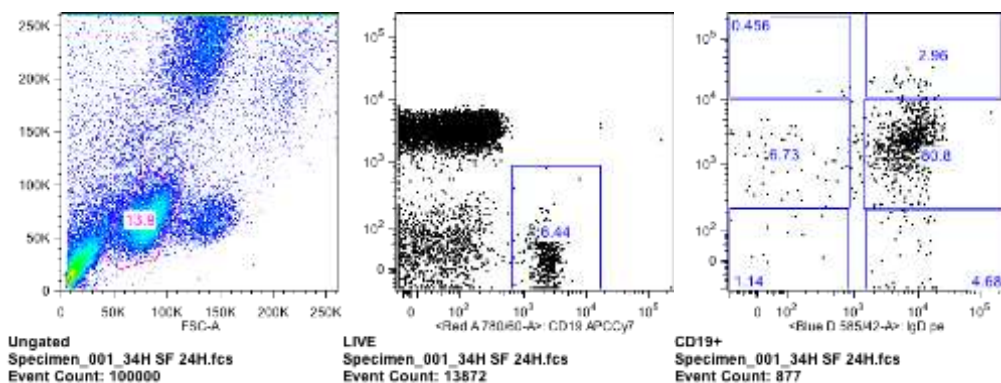
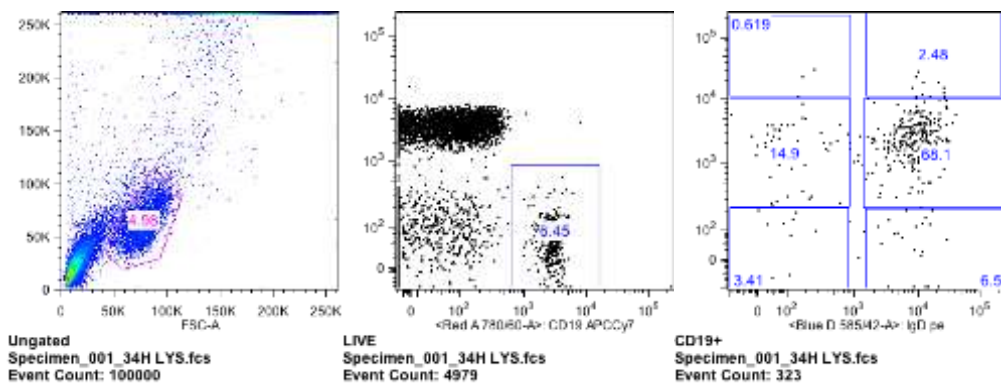
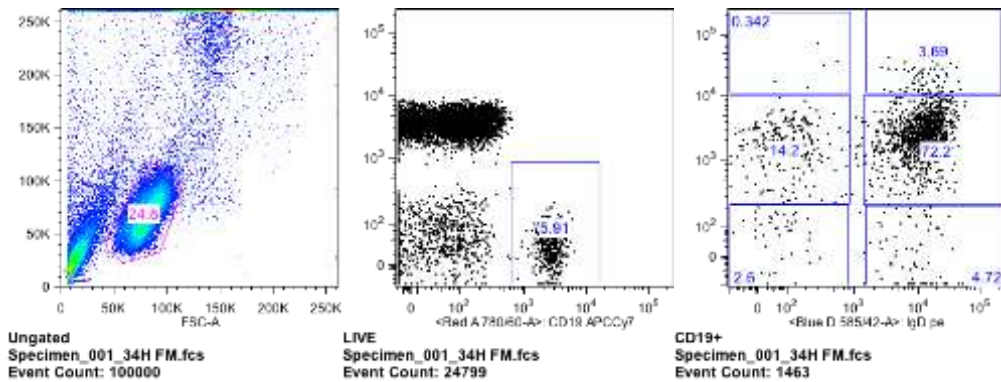
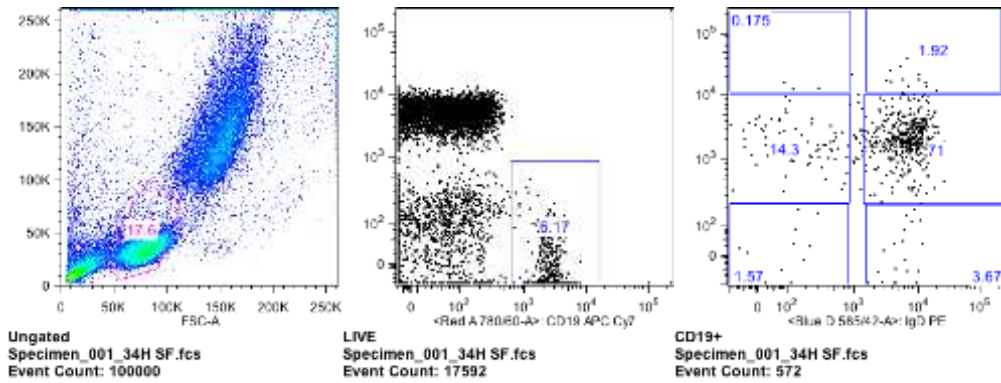


**SUJETO 33 (Clasificación IgD/CD38)**

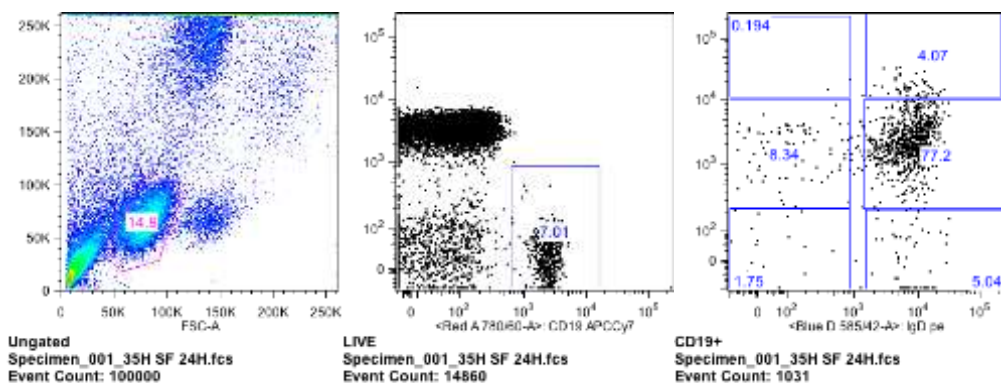
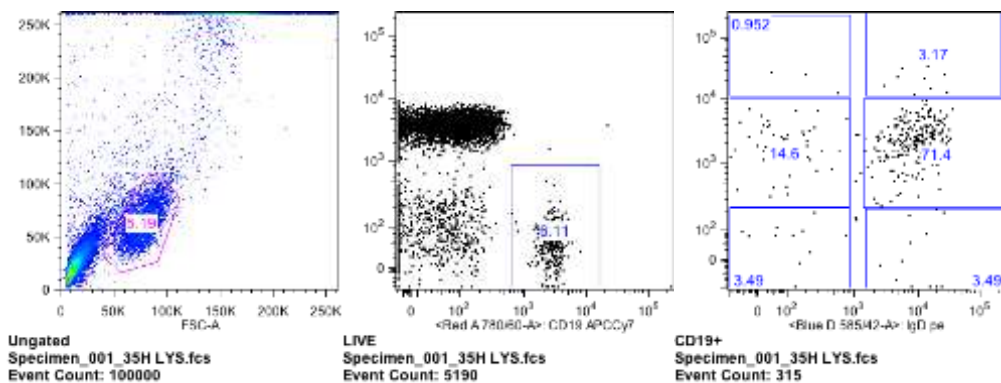
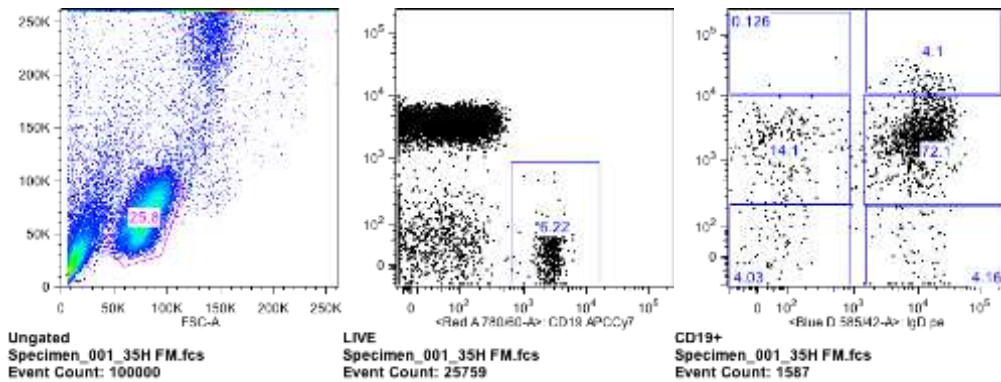
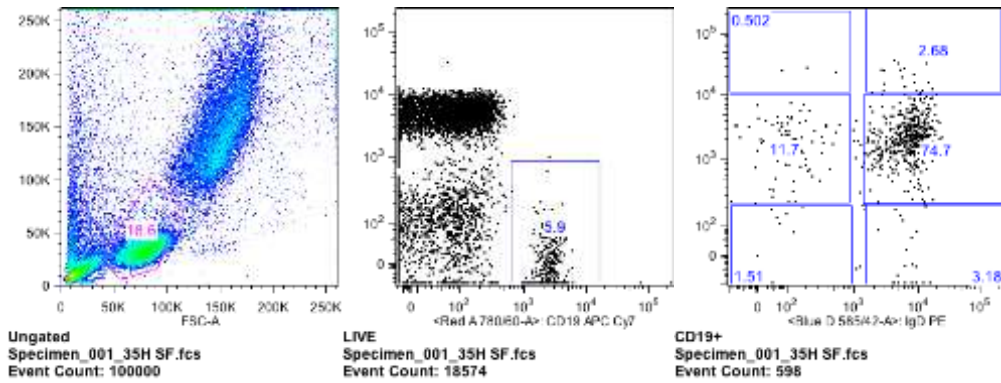




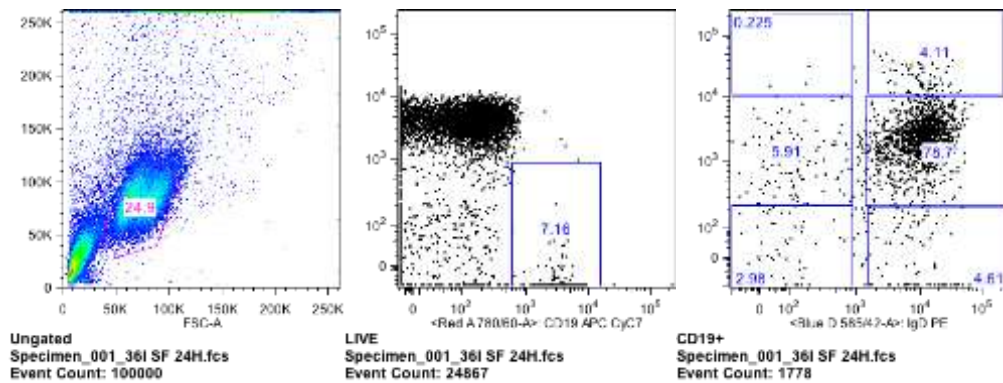
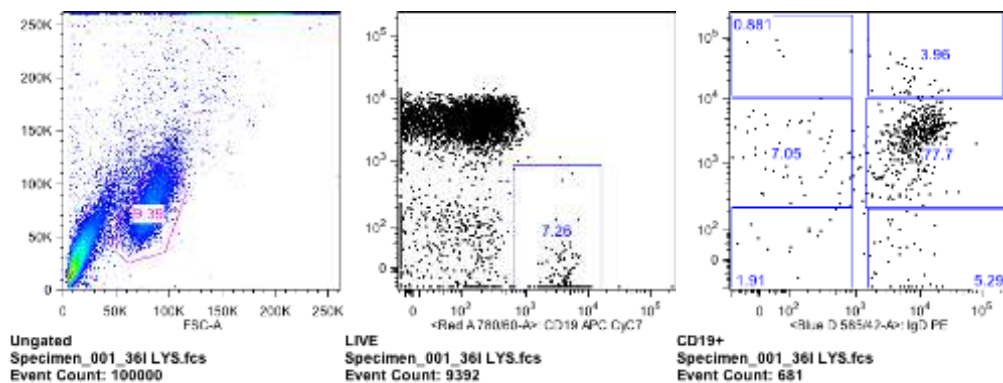
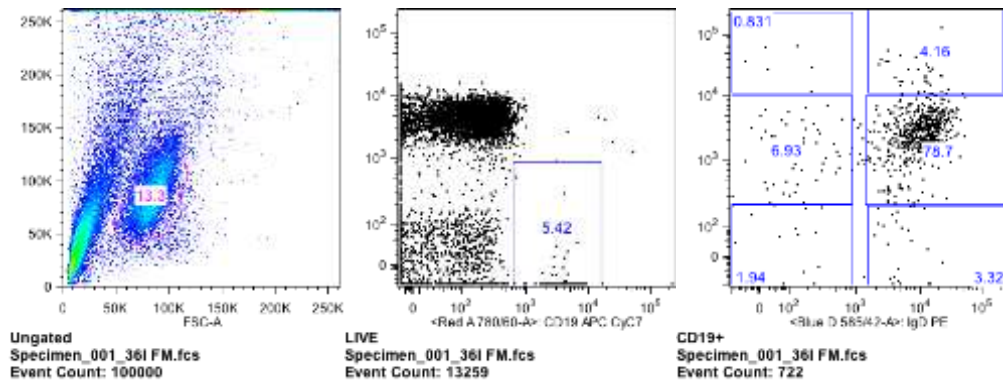
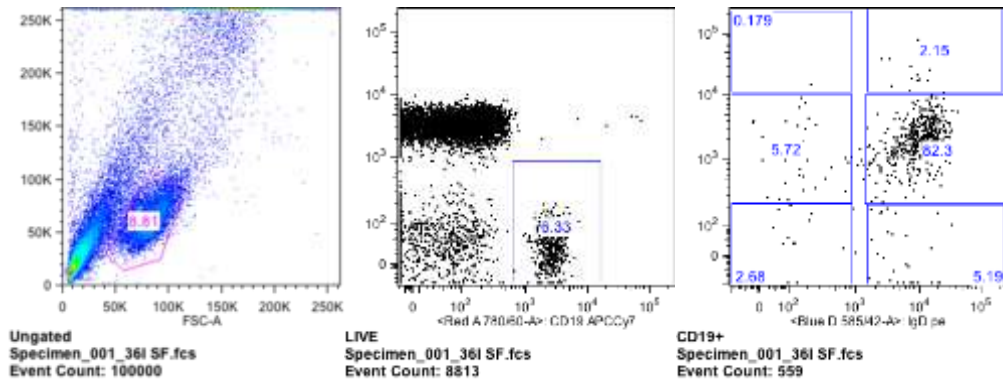
**SUJETO 34 (Clasificación IgD/CD38)**



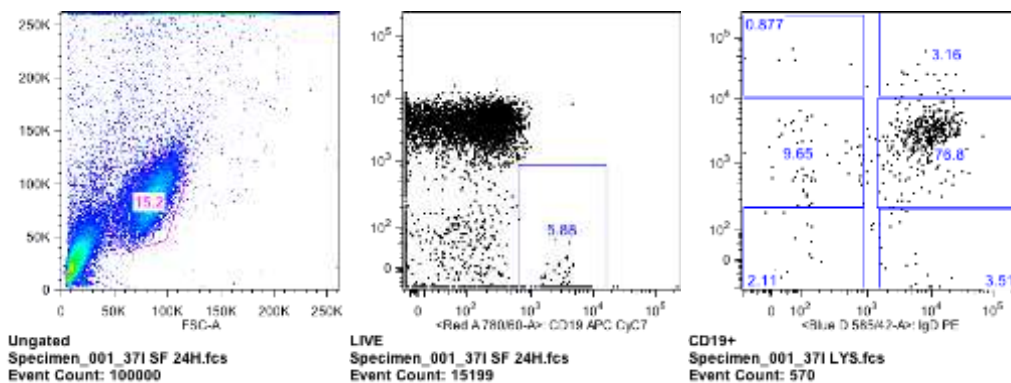
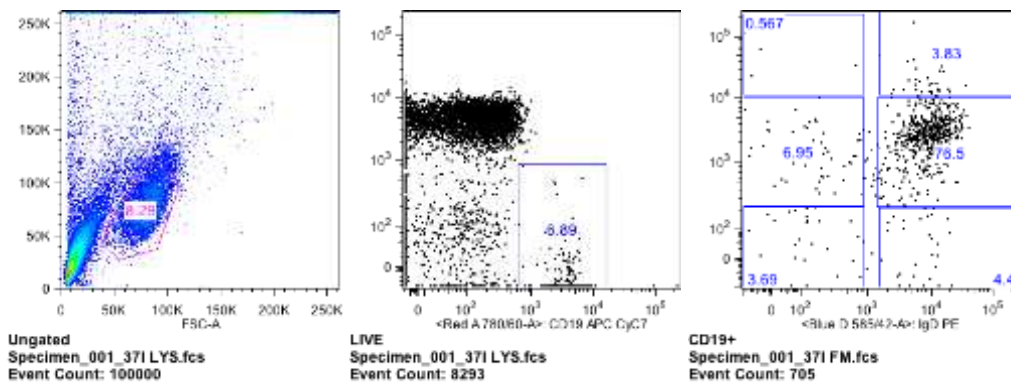
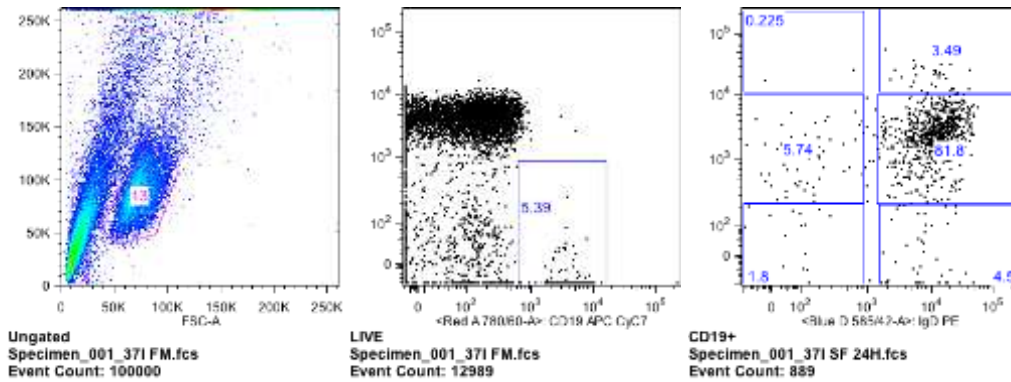
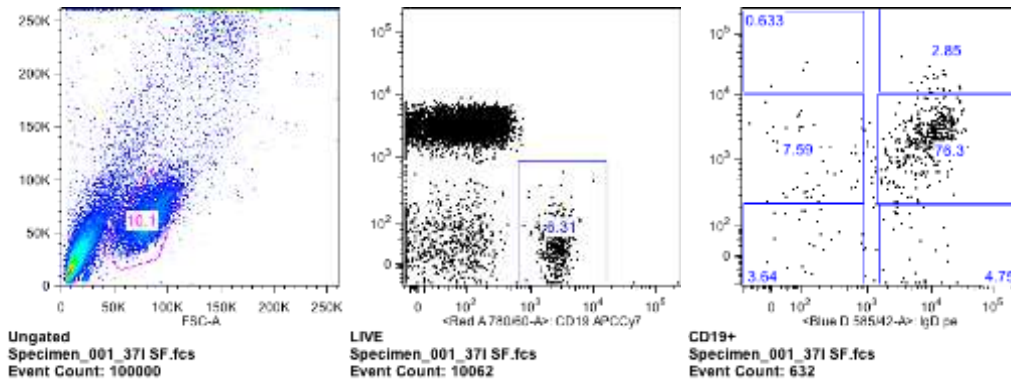
**SUJETO 35 (Clasificación IgD/CD38)**



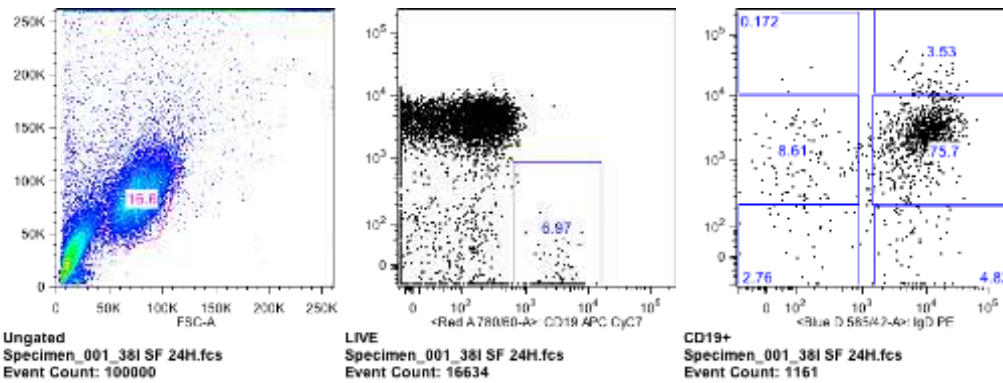
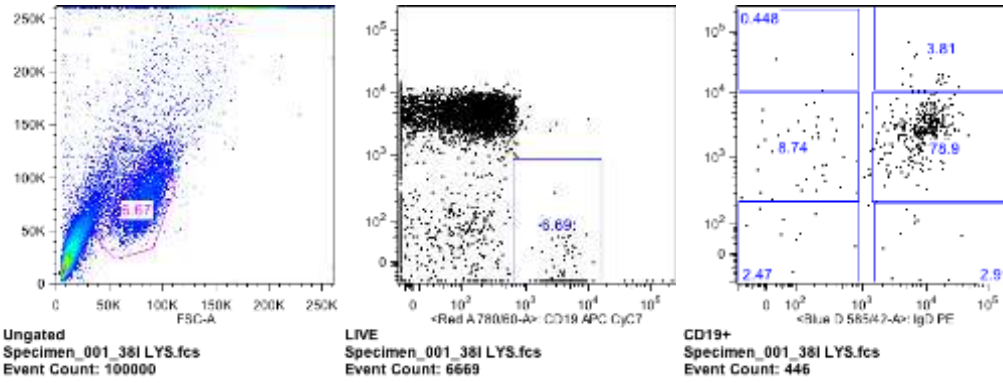
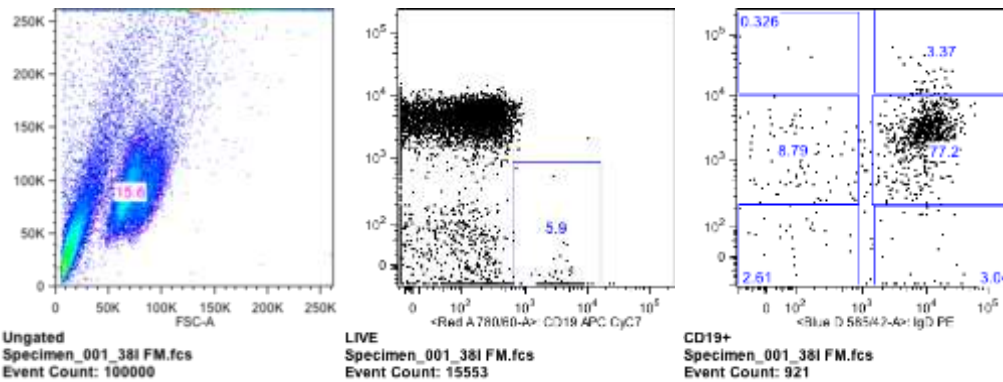
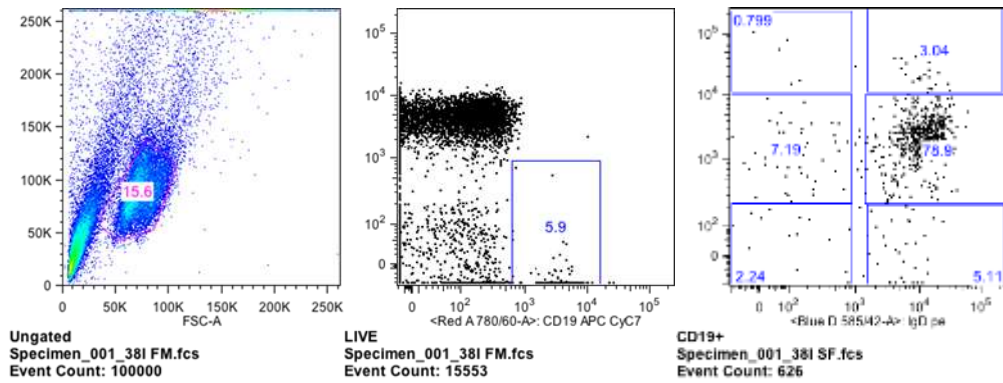
**SUJETO 36 (Clasificación IgD/CD38)**



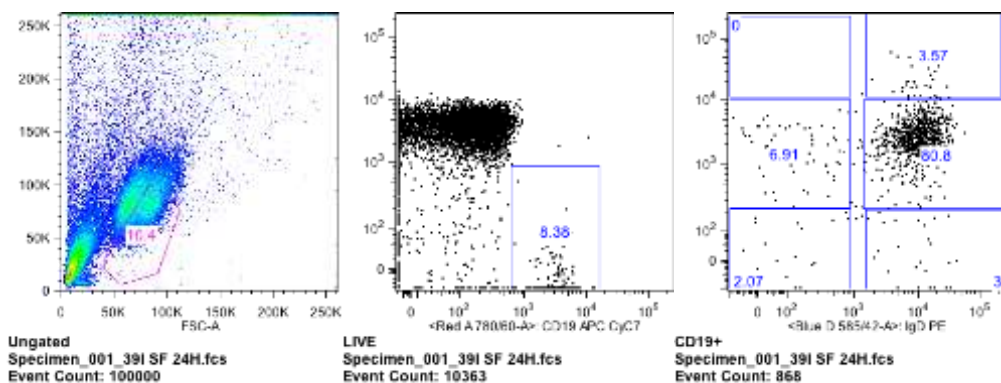
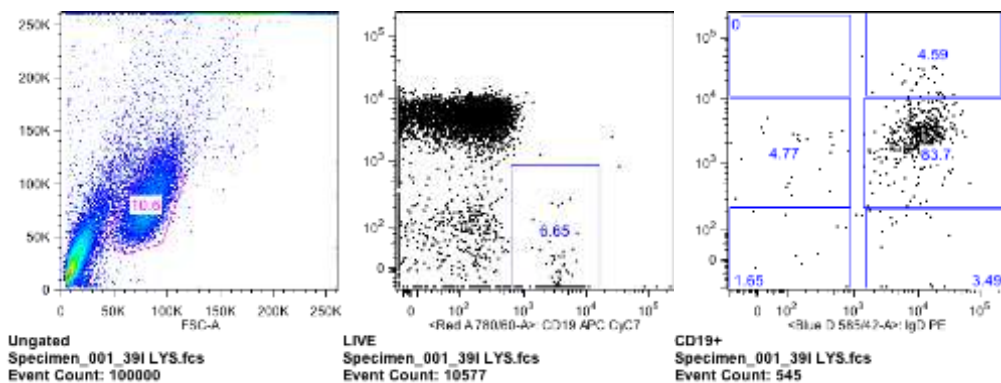
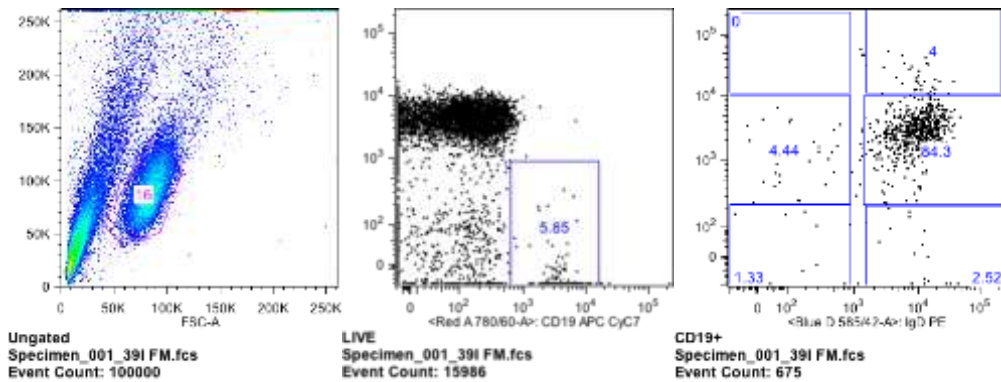
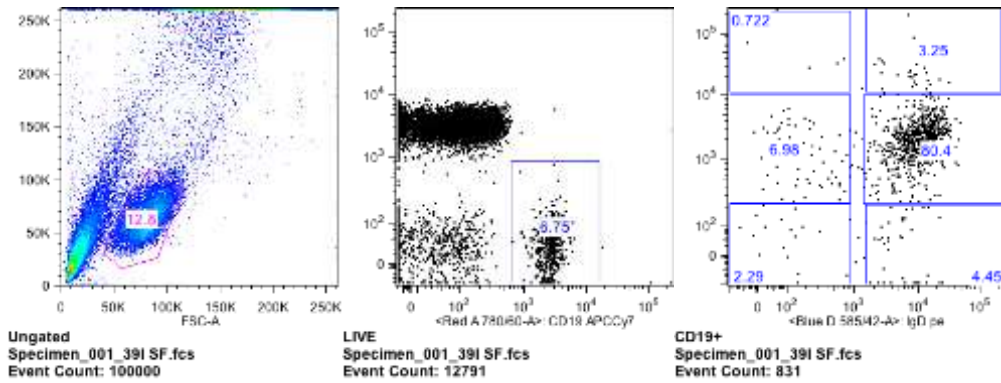
**SUJETO 37 (Clasificación IgD/CD38)**



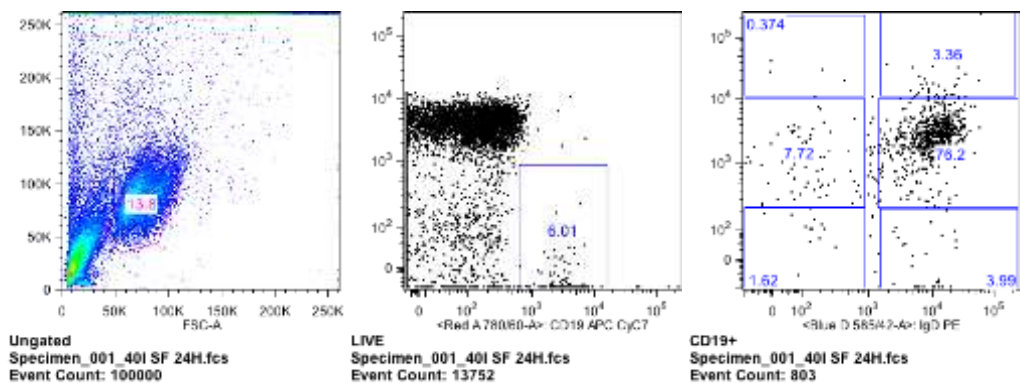
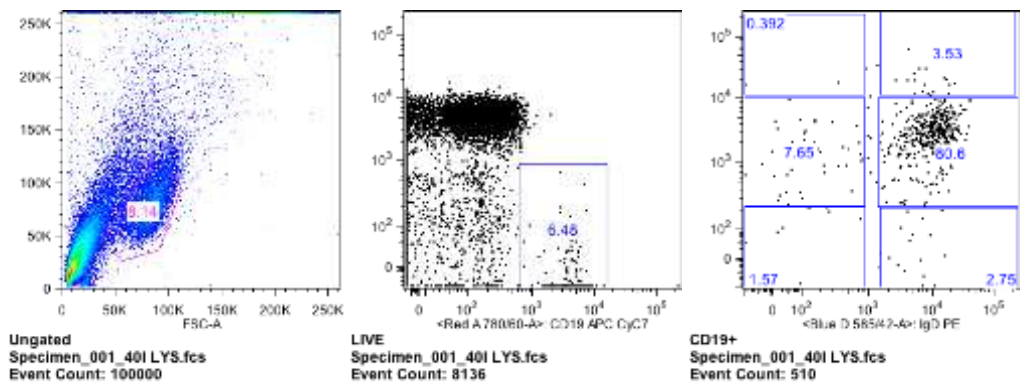
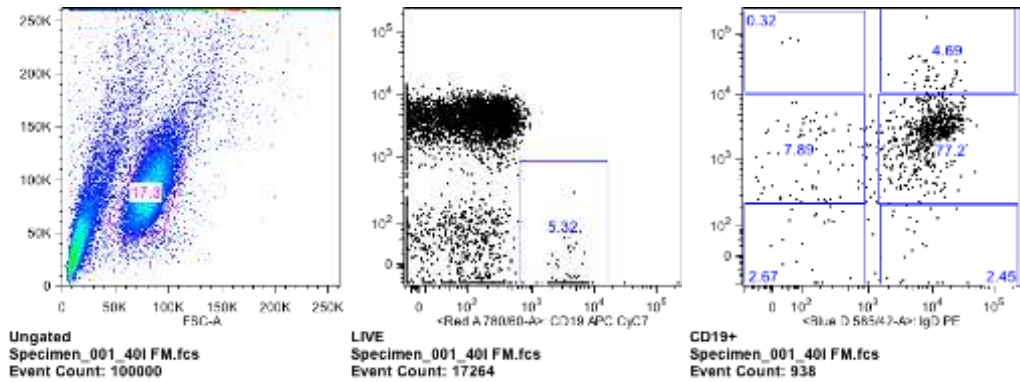
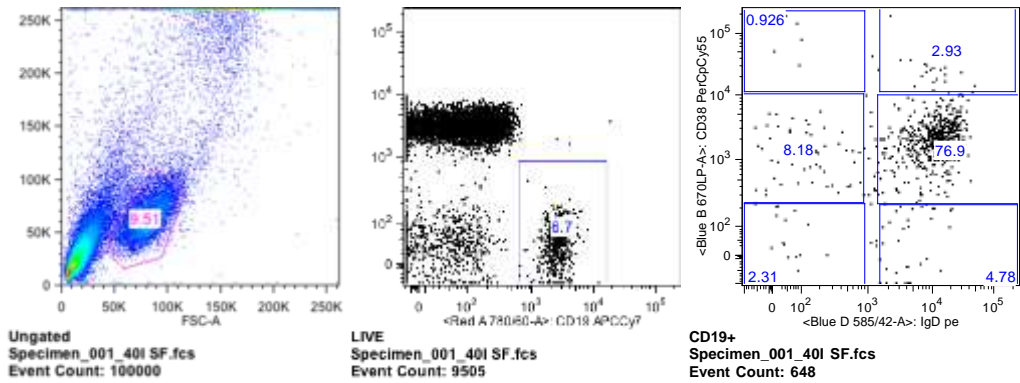
**SUJETO 38 (Clasificación IgD/CD38)**



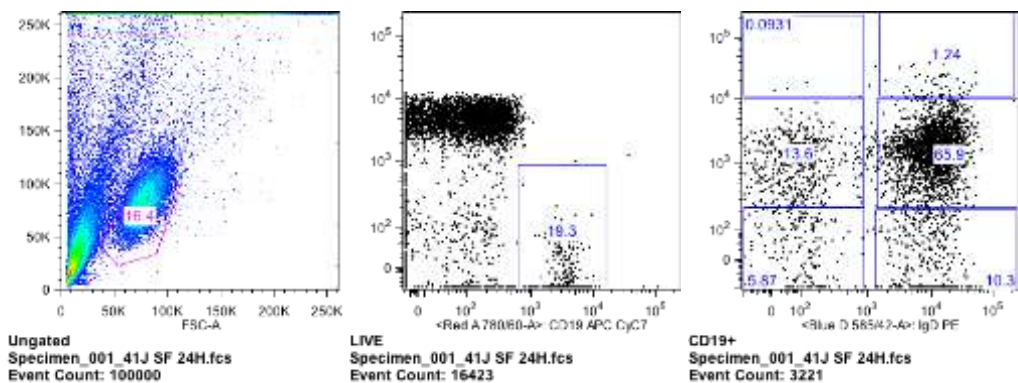
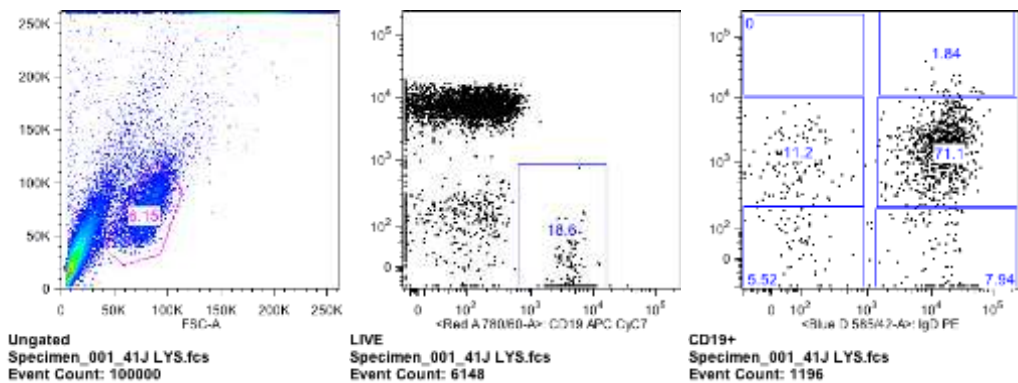
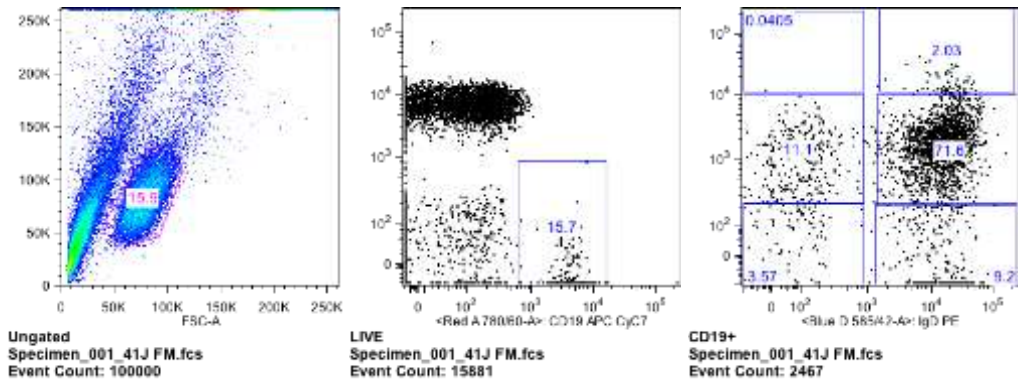
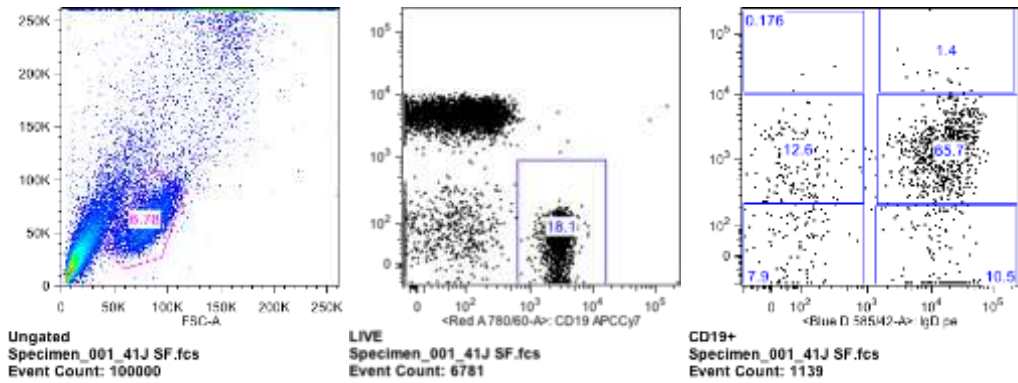
**SUJETO 39 (Clasificación IgD/CD38)**



**SUJETO 40 (Clasificación IgD/CD38)**

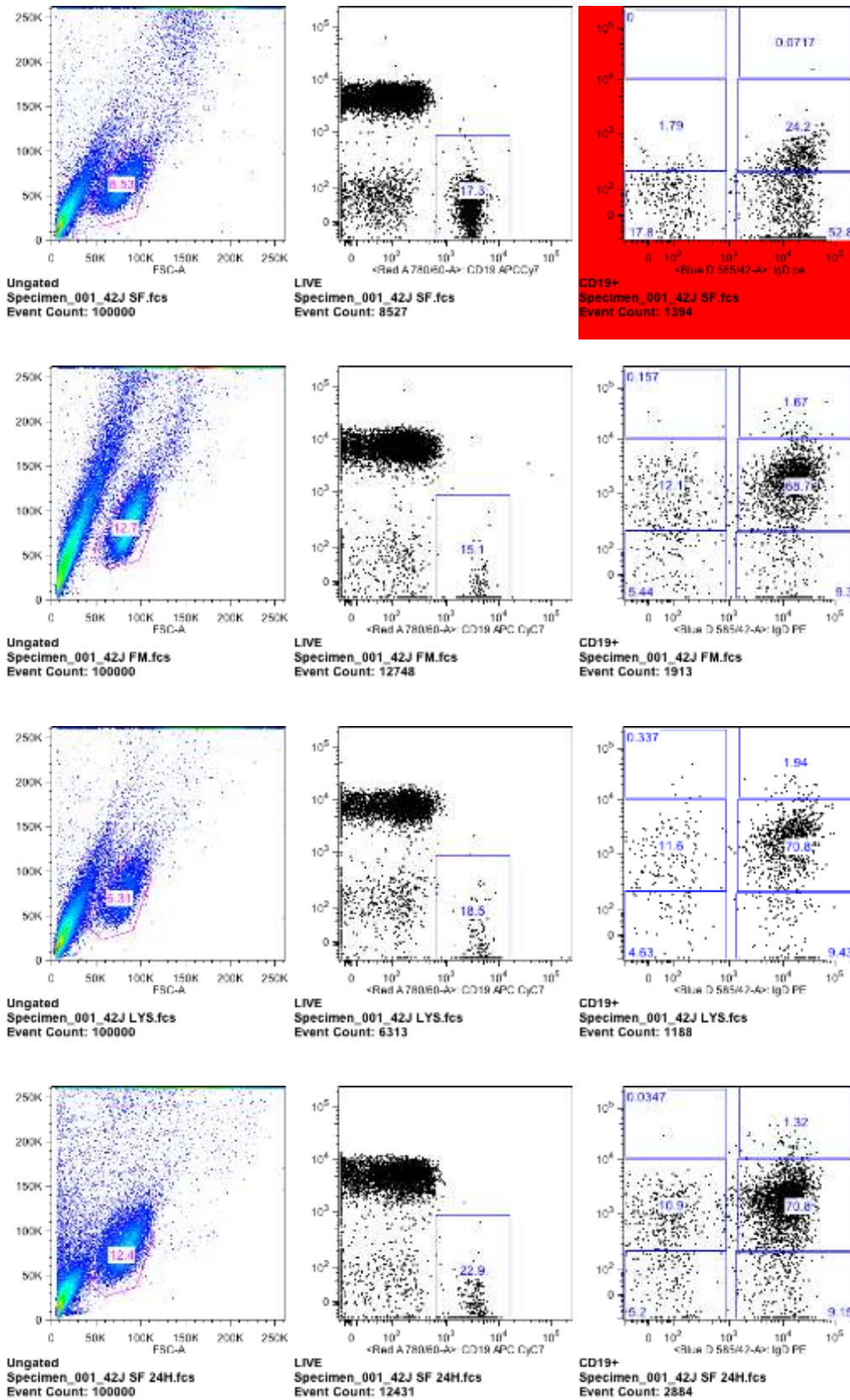


**SUJETO 41 (Clasificación IgD/CD38)**

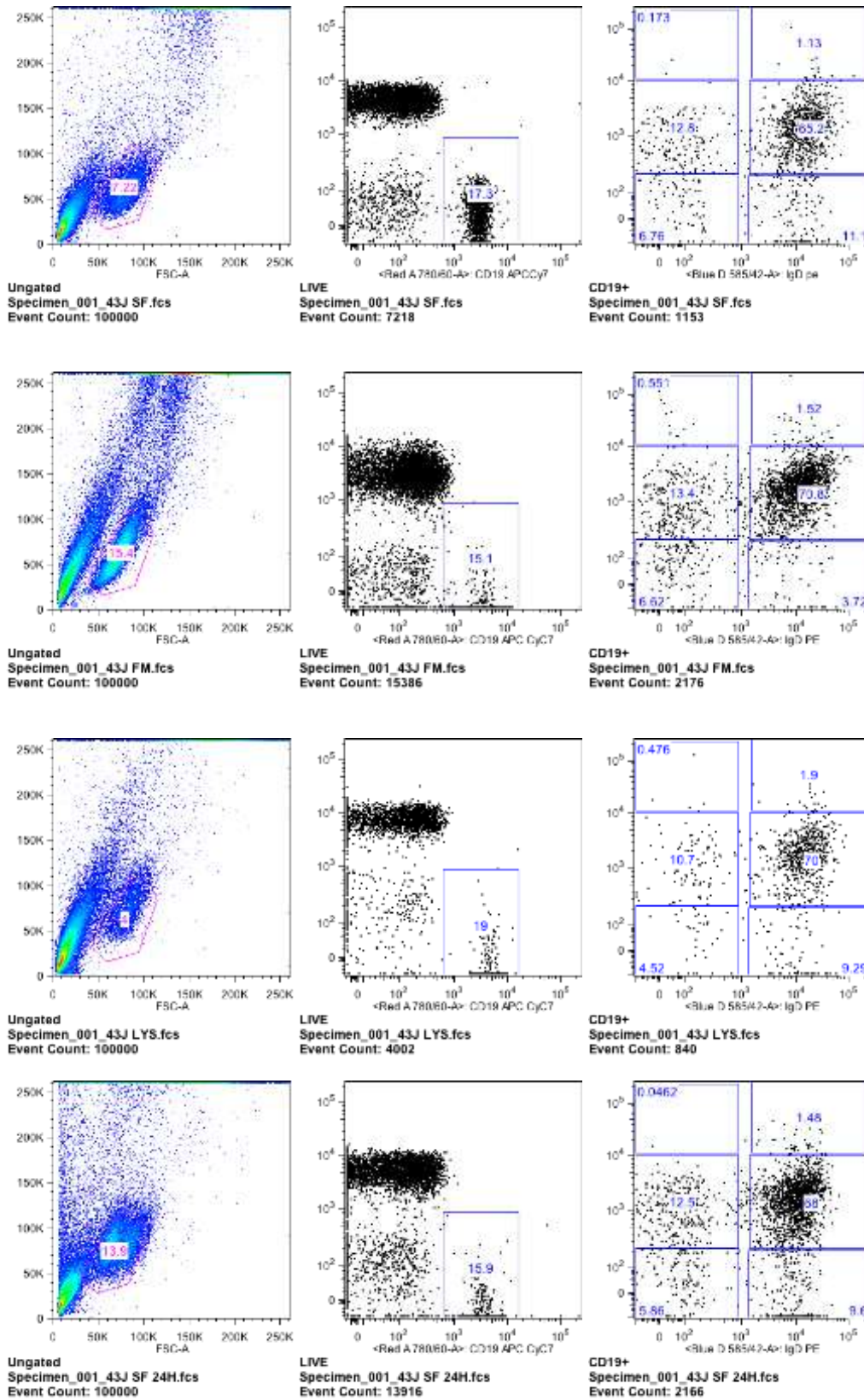




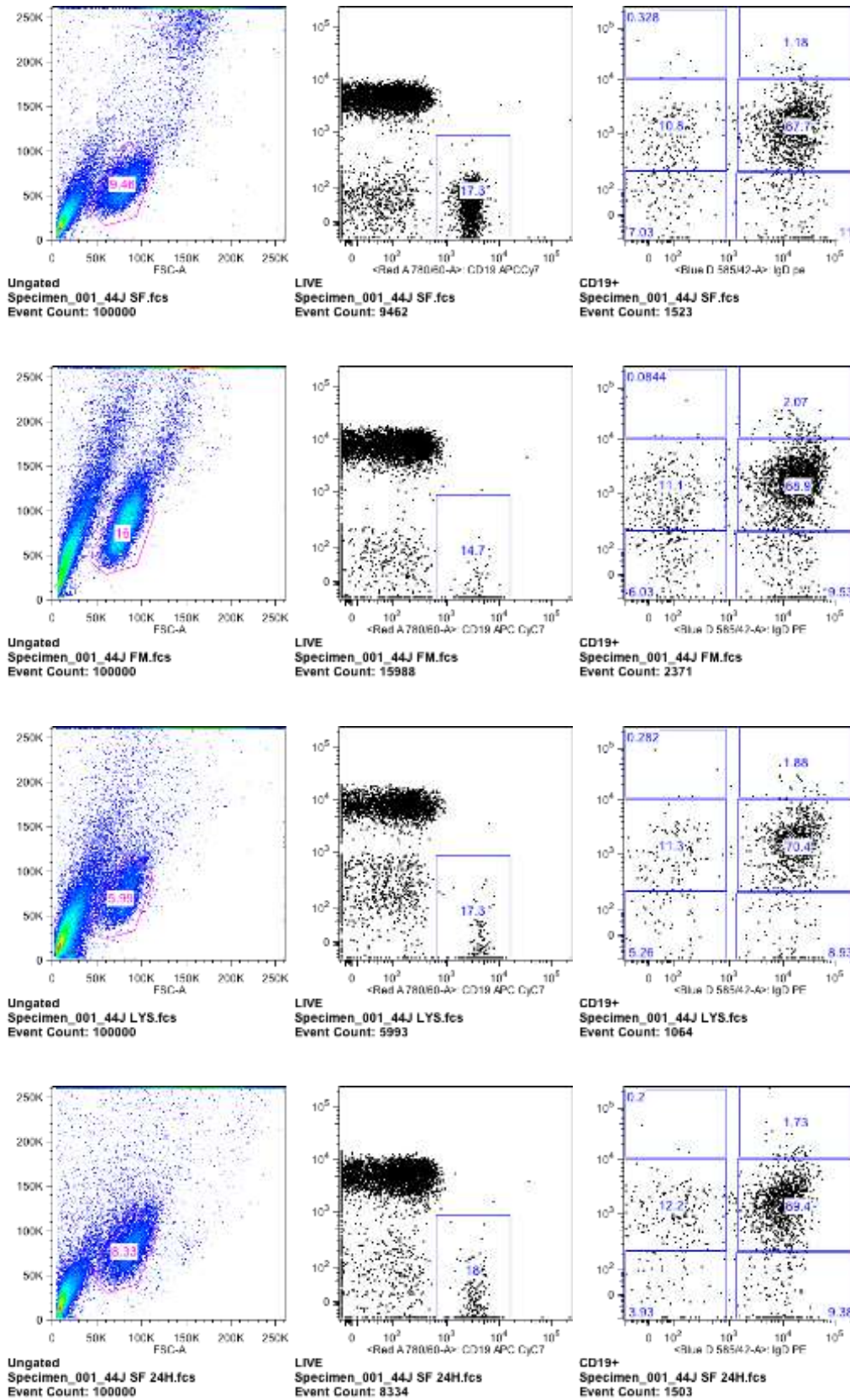
**SUJETO 42 (Clasificación IgD/CD38)**



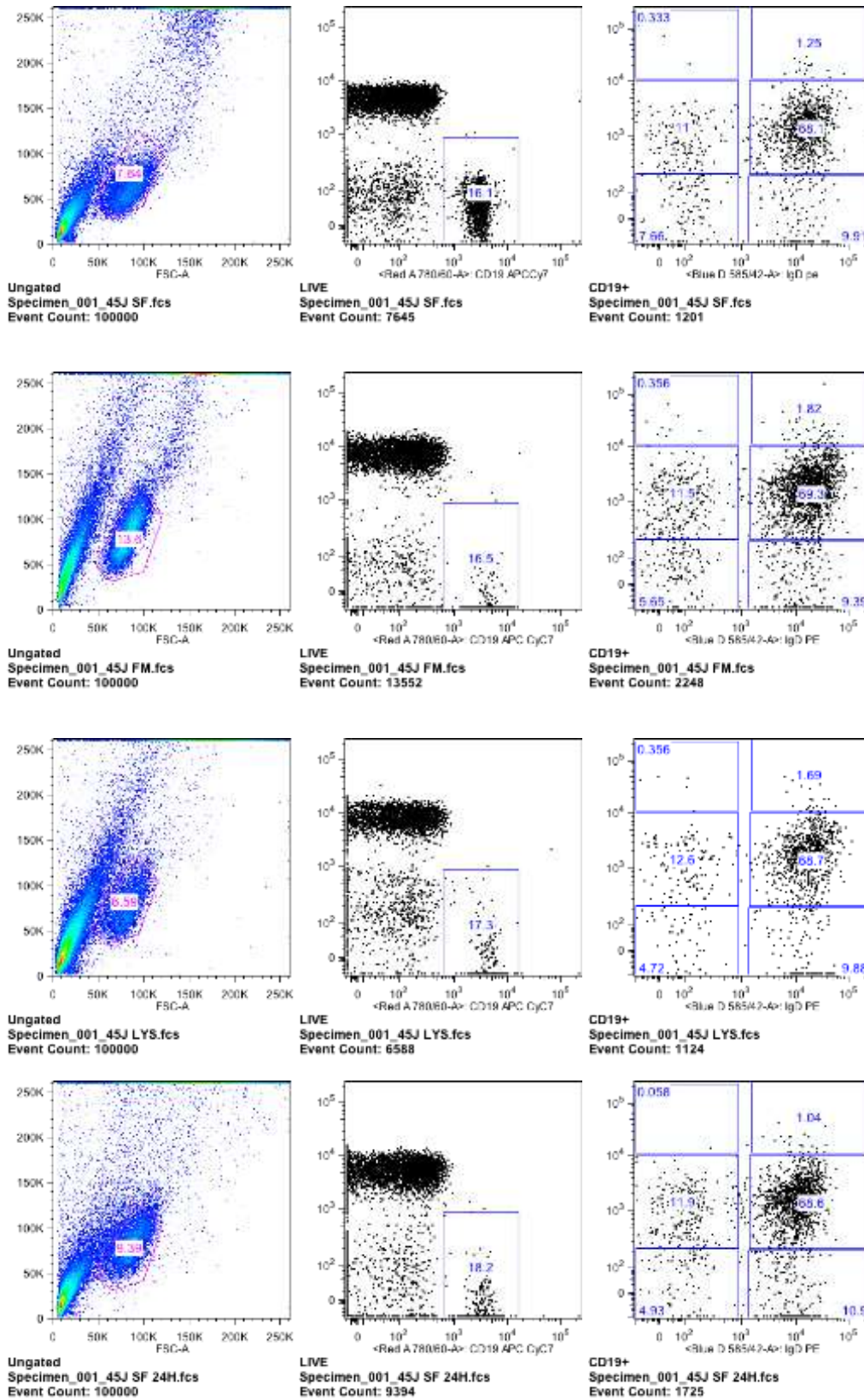
**SUJETO 43 (Clasificación IgD/CD38)**



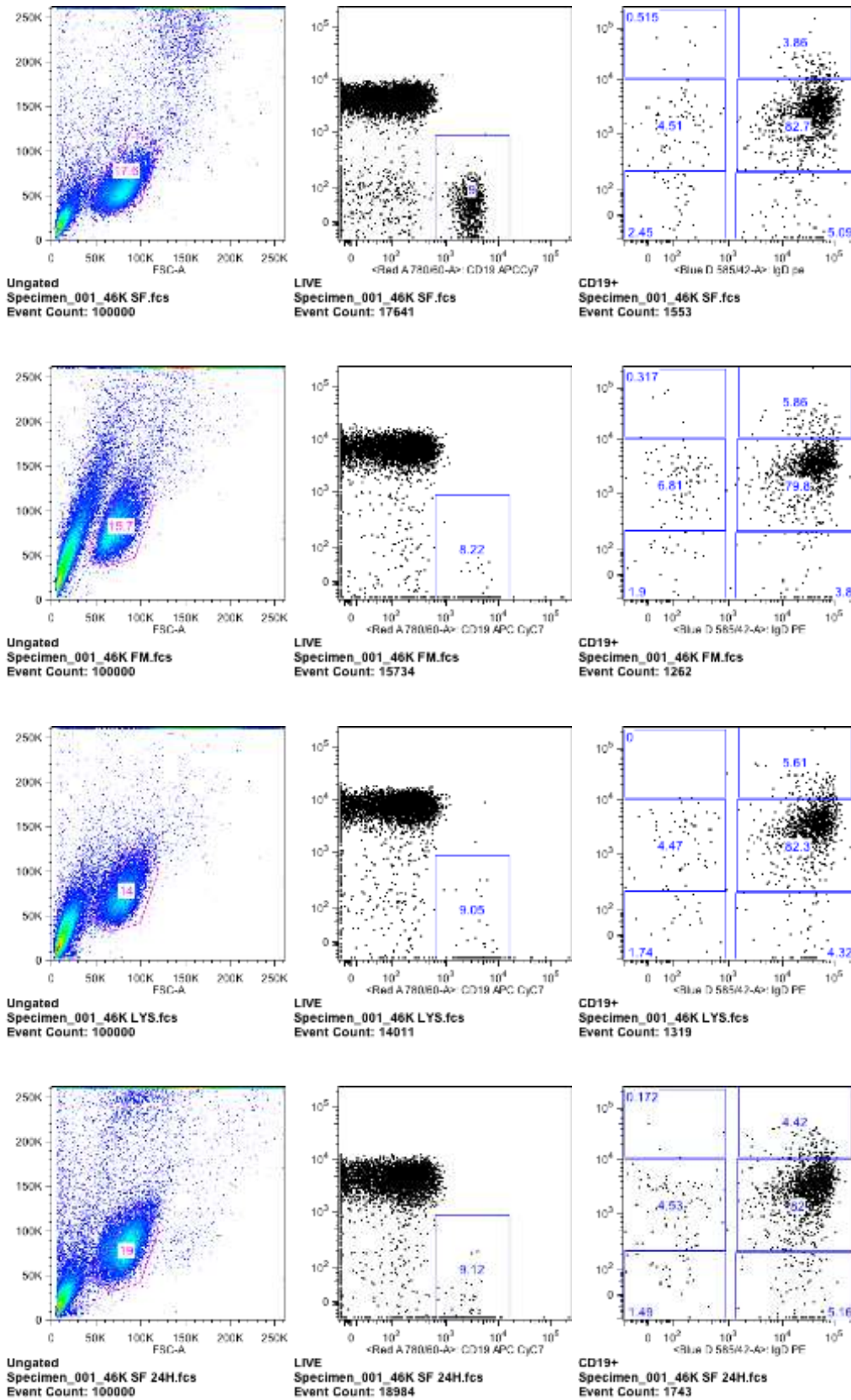
**SUJETO 44 (Clasificación IgD/CD38)**



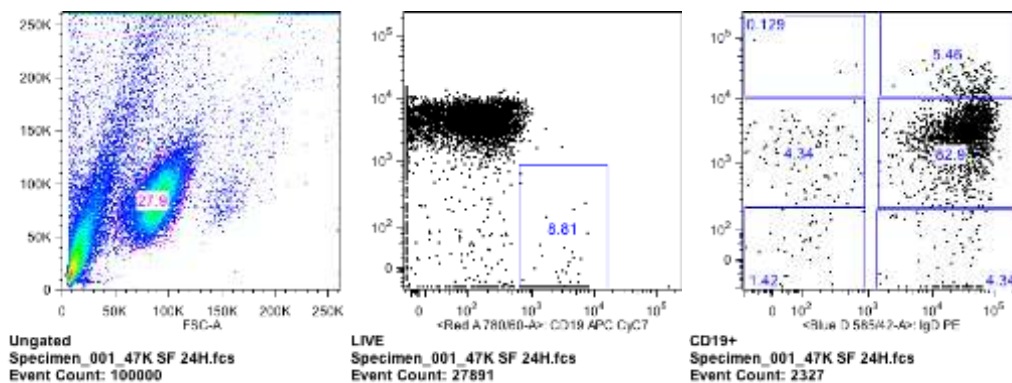
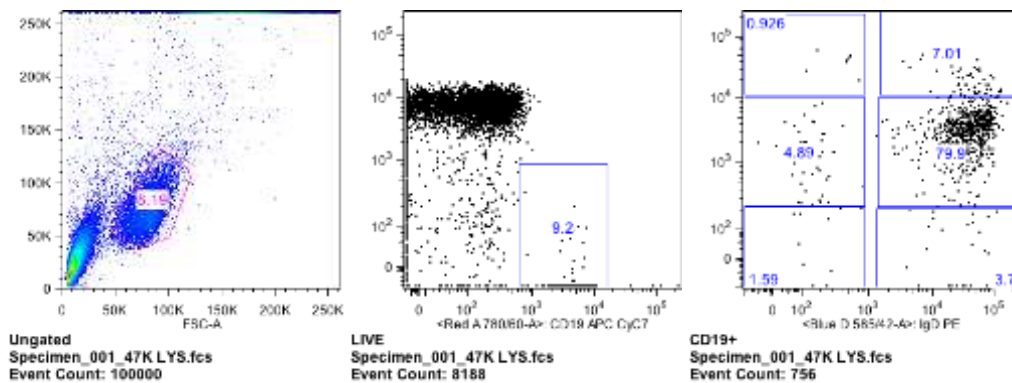
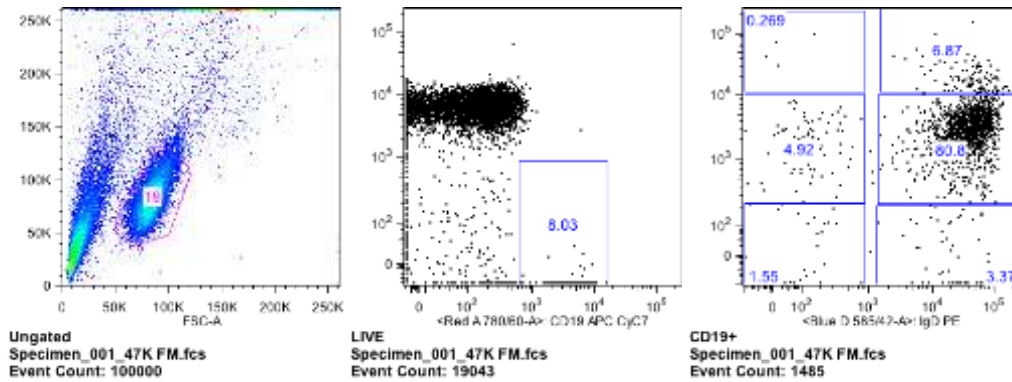
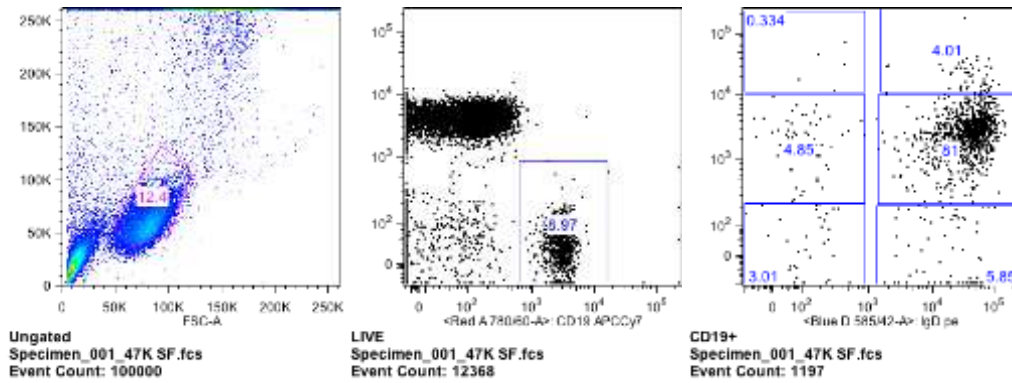
**SUJETO 45 (Clasificación IgD/CD38)**



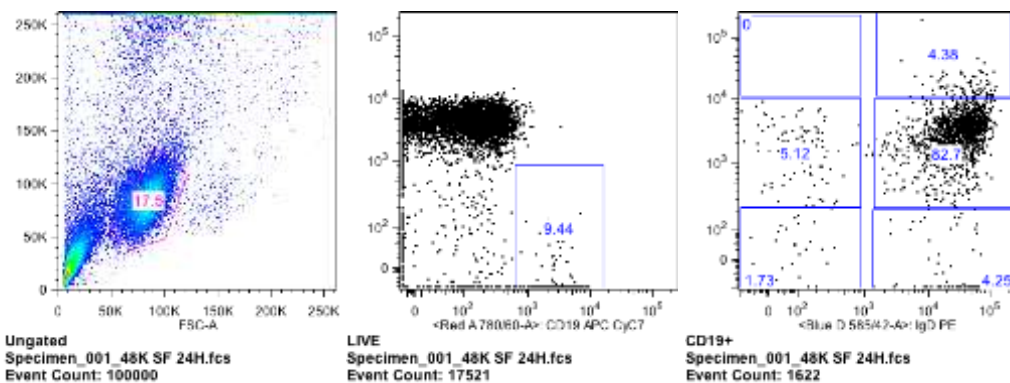
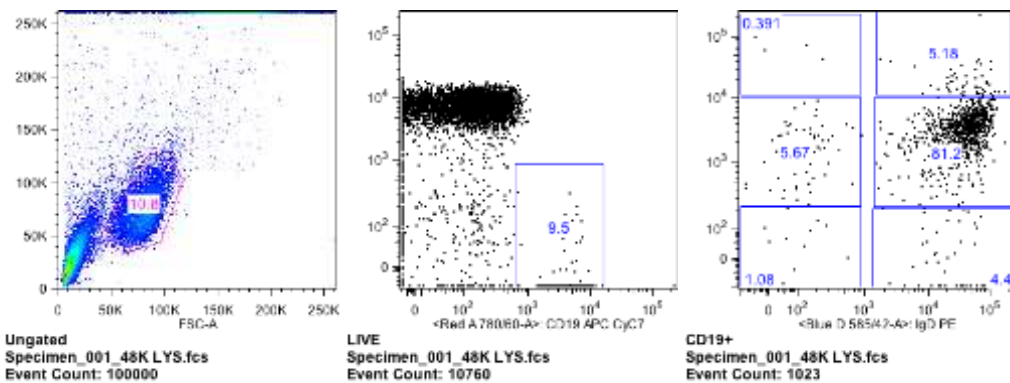
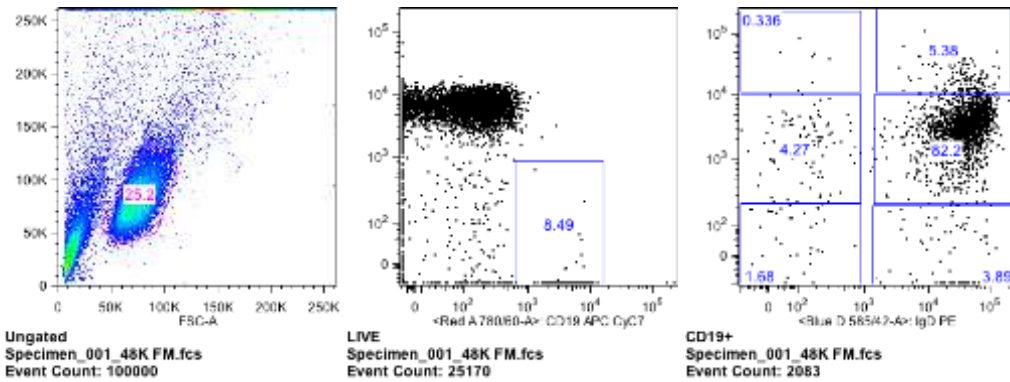
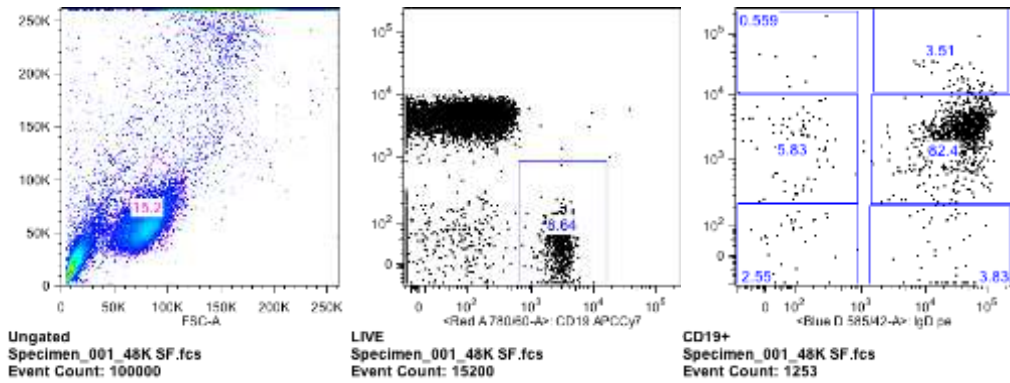
**SUJETO 46 (Clasificación IgD/CD38)**



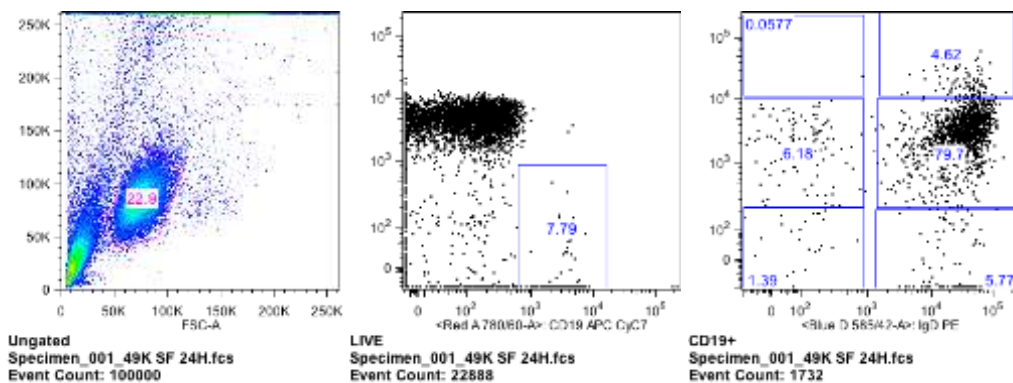
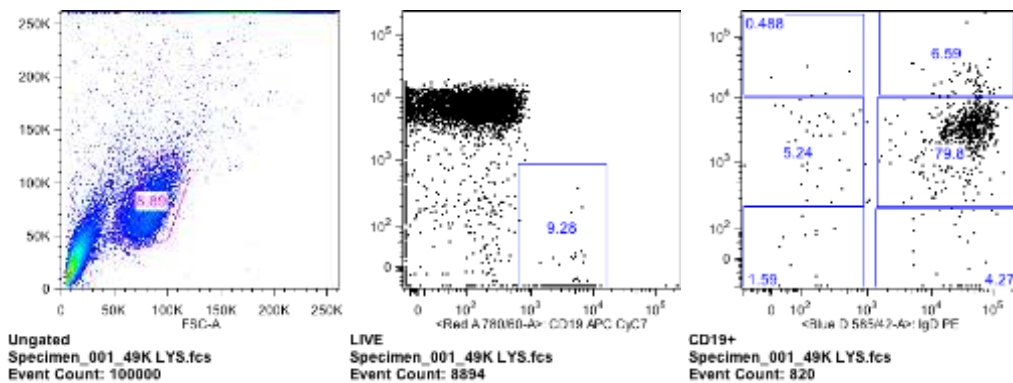
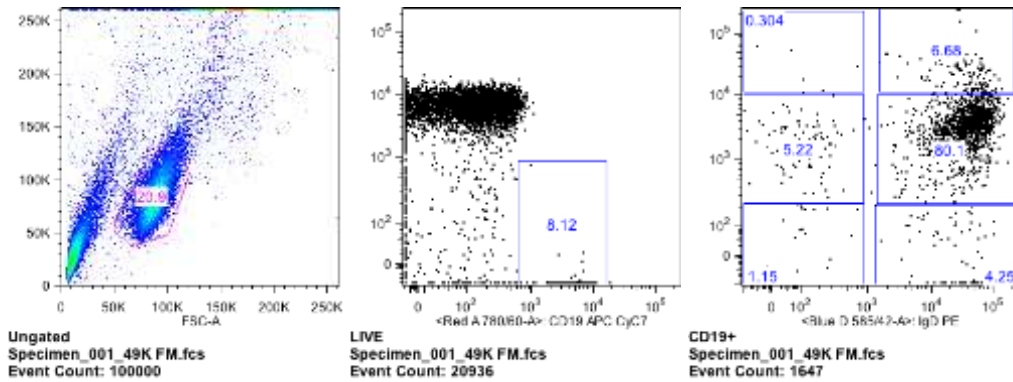
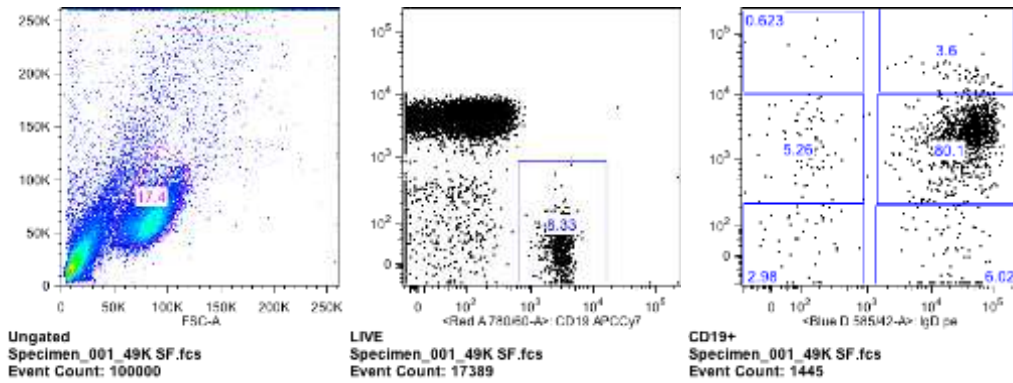
**SUJETO 47 (Clasificación IgD/CD38)**



**SUJETO 48 (Clasificación IgD/CD38)**

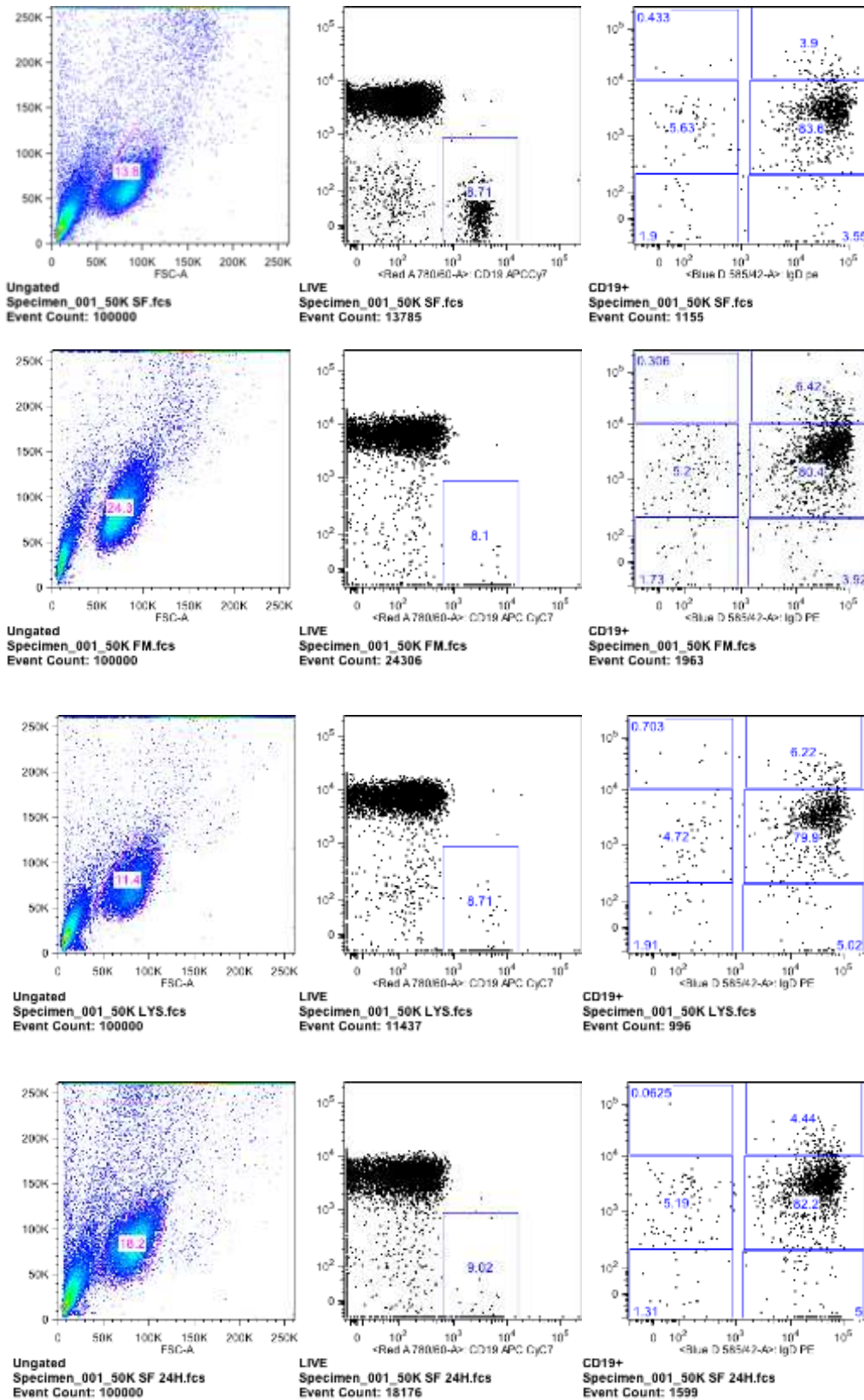


**SUJETO 49 (Clasificación IgD/CD38)**





**SUJETO 50 (Clasificación IgD/CD38)**



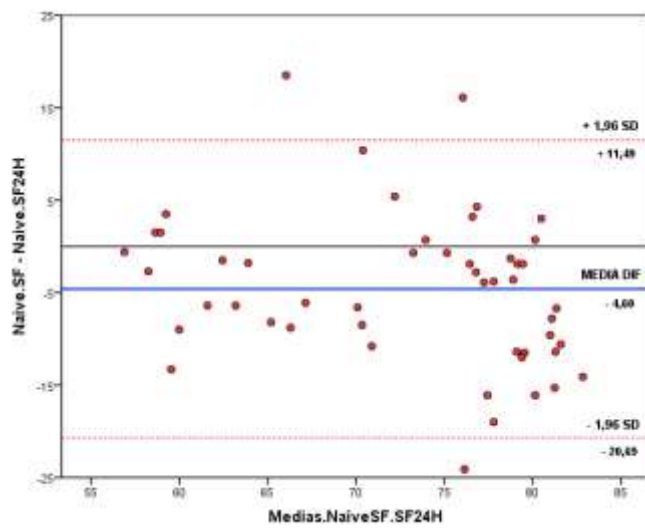
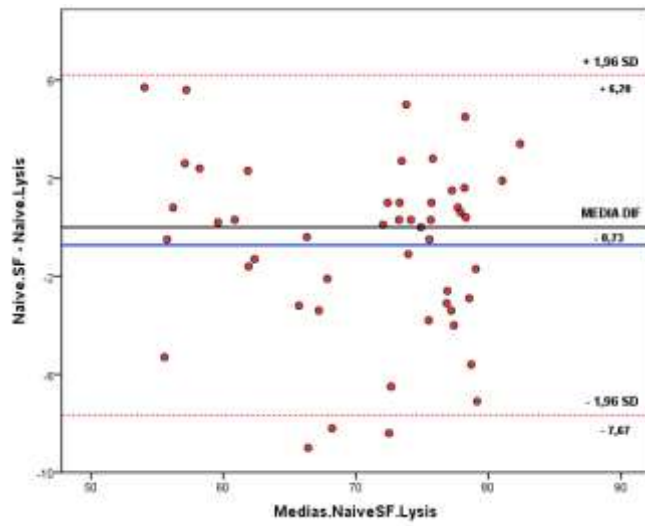
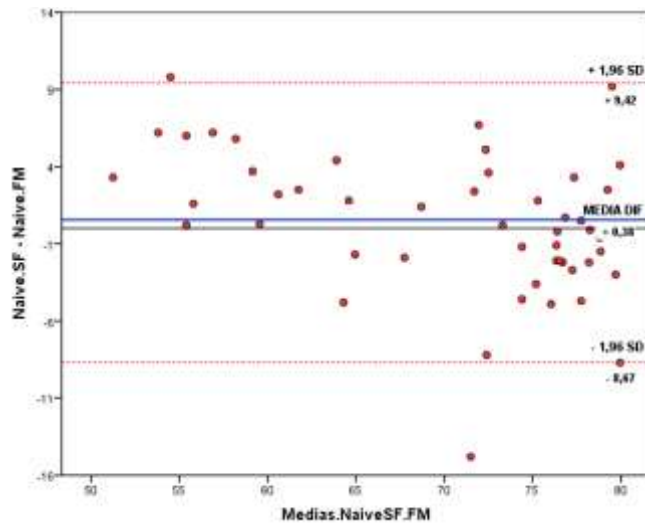
## 9.3. ANEXO III

---

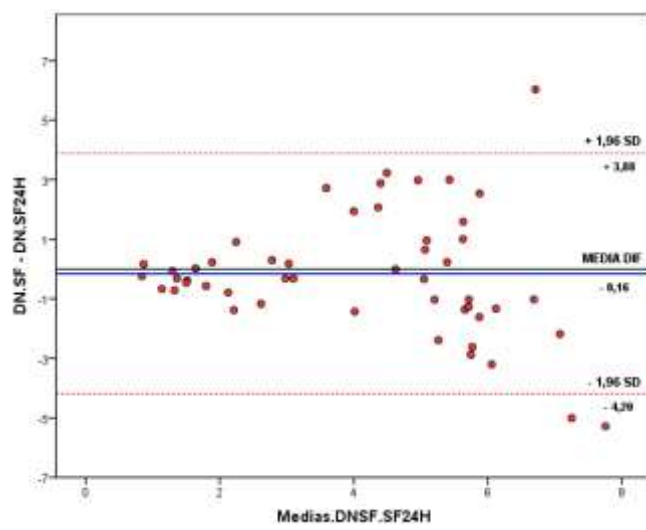
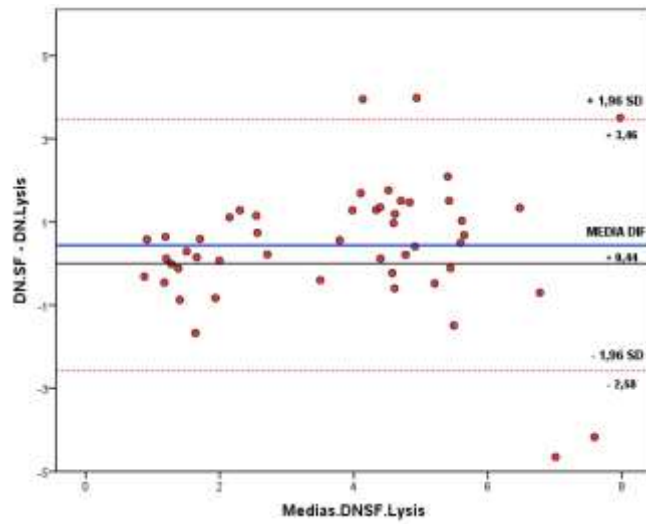
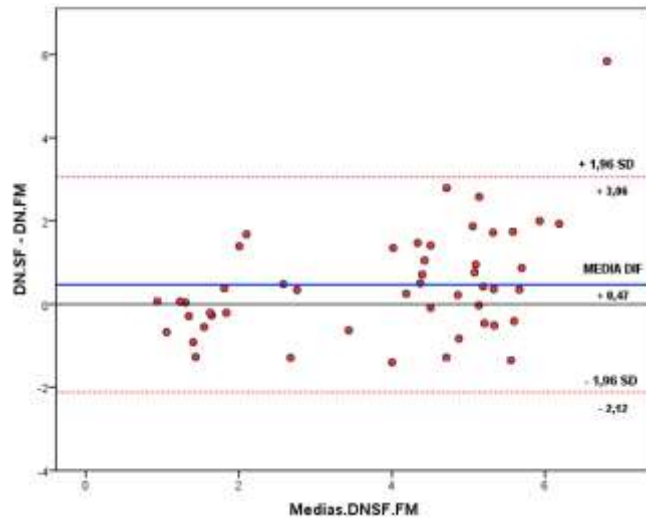
A continuación se adjuntan los gráficos de Bland y Altman para cada una de las subpoblaciones linfocitarias, reflejando los resultados obtenidos cuando se comparan los 3 procedimientos en estudio, respecto al procedimiento considerado como “gold standard”.

En un segundo bloque, se expresan los gráficos de Bland y Altman de la intensidad de fluorescencia de cada una de los fluorocromos utilizados (Ig D, CD19, CD27, CD38 y CD3) en las distintas subpoblaciones, reflejando los resultados obtenidos cuando se comparan los 3 procedimientos en estudio, respecto al procedimiento considerado como “gold standard”.

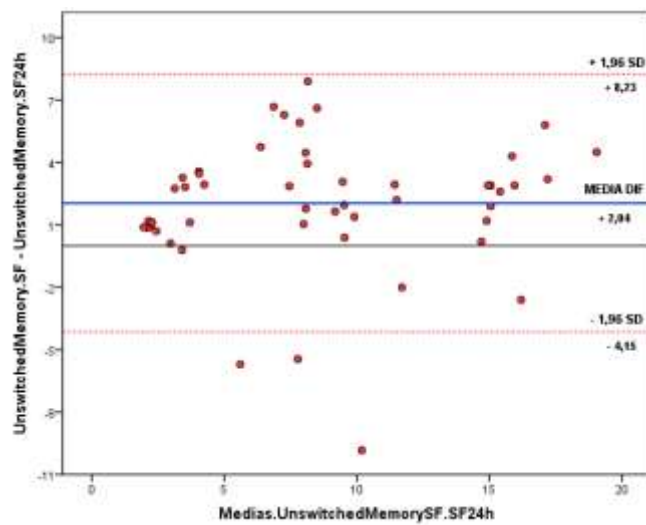
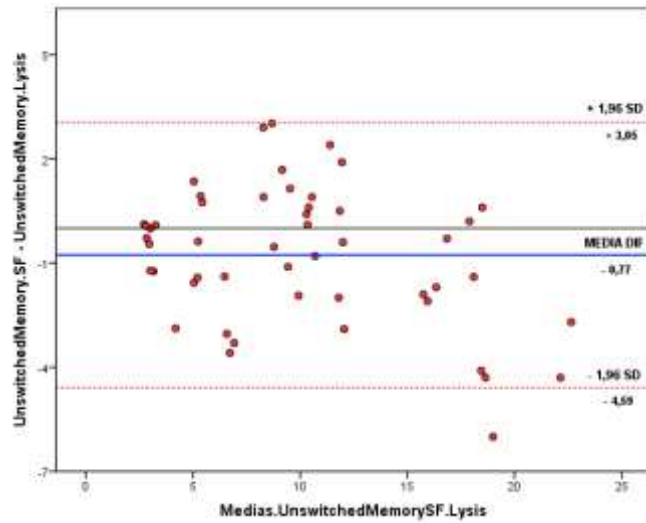
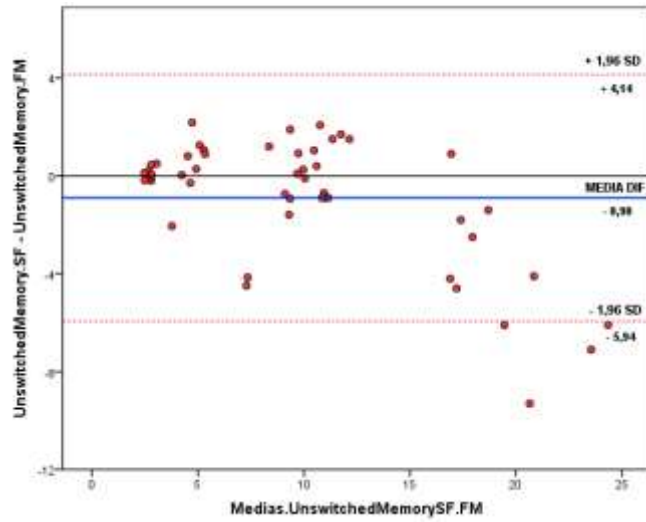
### 1. NAIVE.



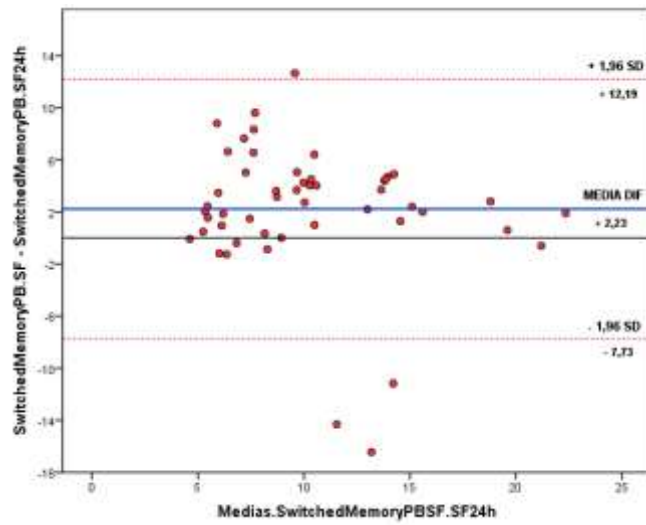
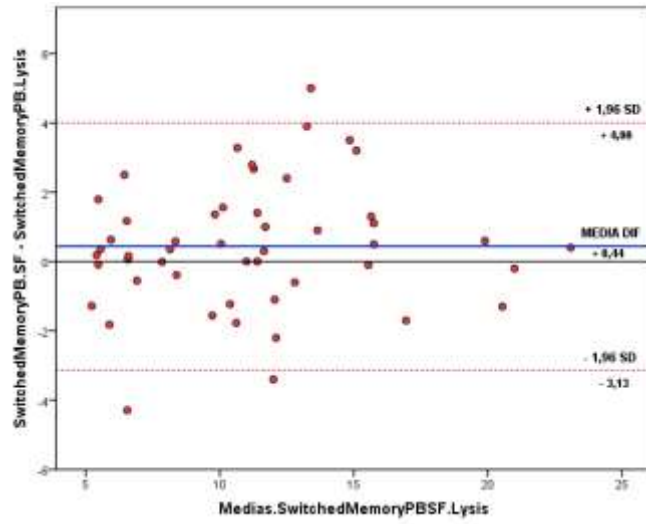
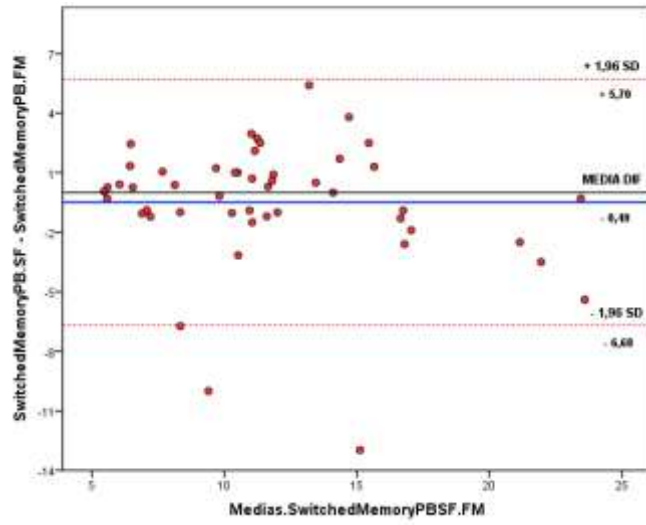
## 2. DOBLE NEGATIVAS (DN).



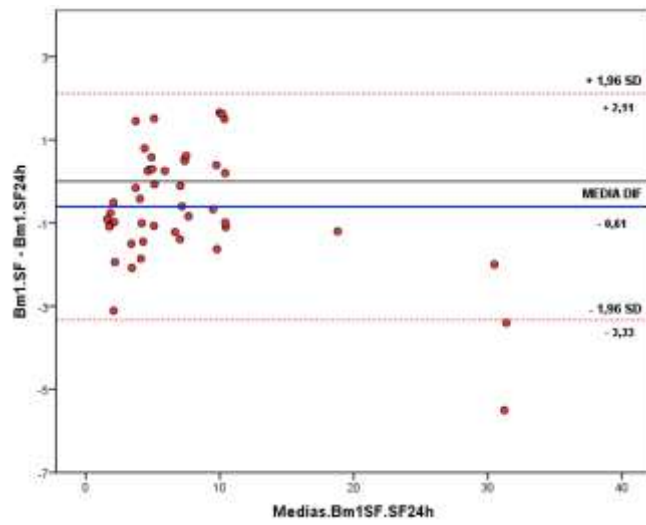
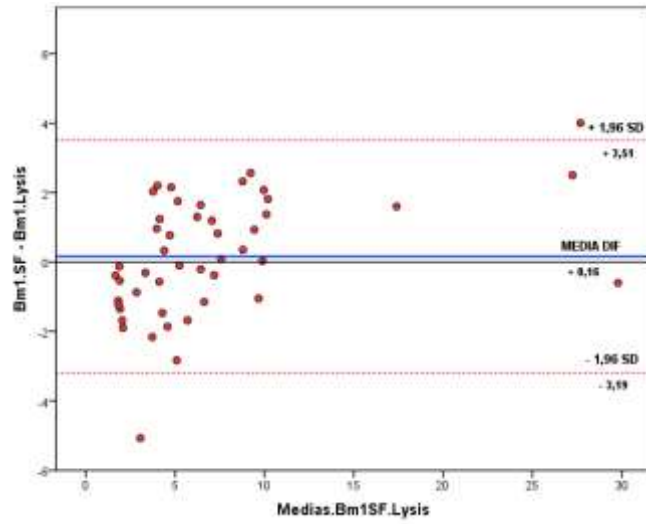
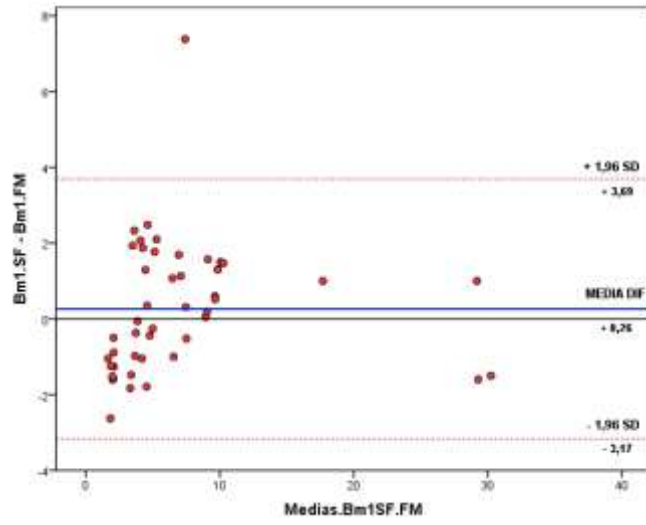
### 3. UNSWITCHED MEMORY.



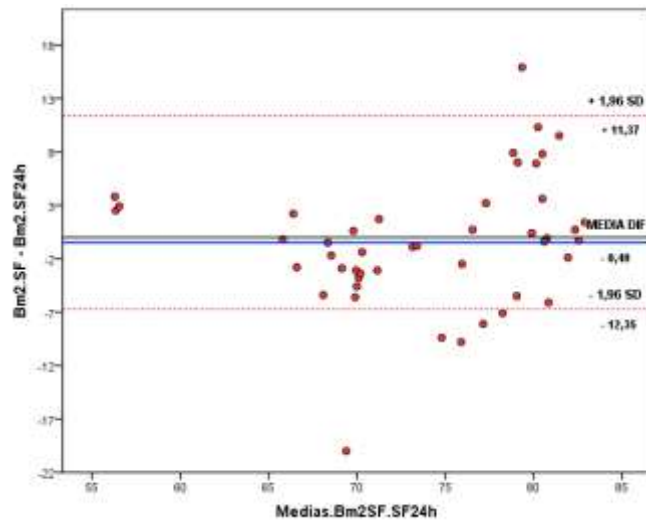
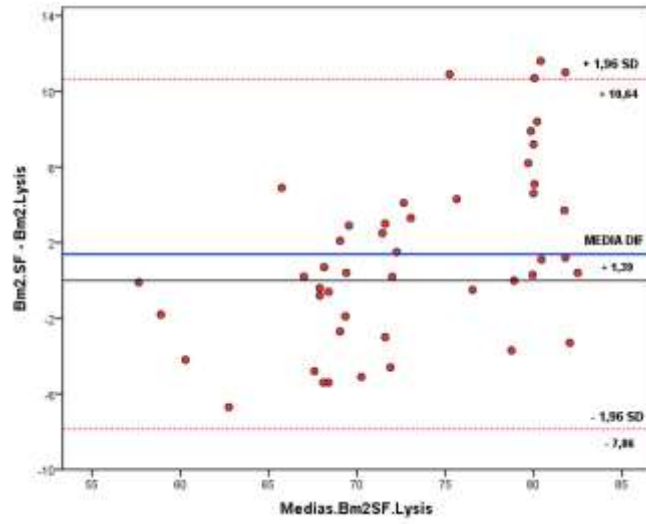
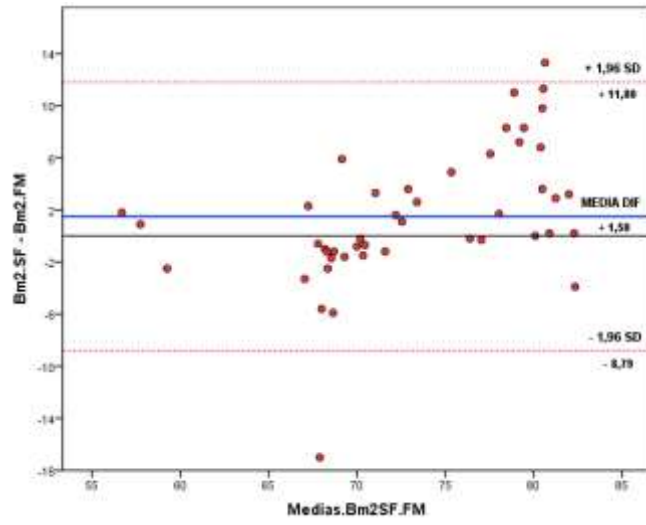
#### 4. SWITCHED MEMORY.



. BM1.

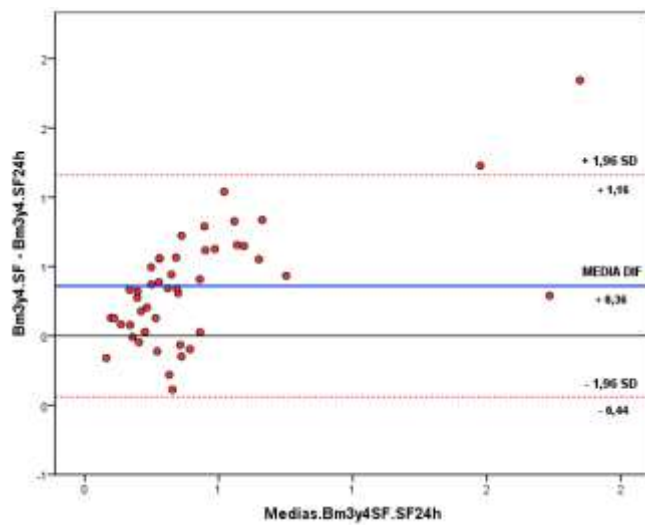
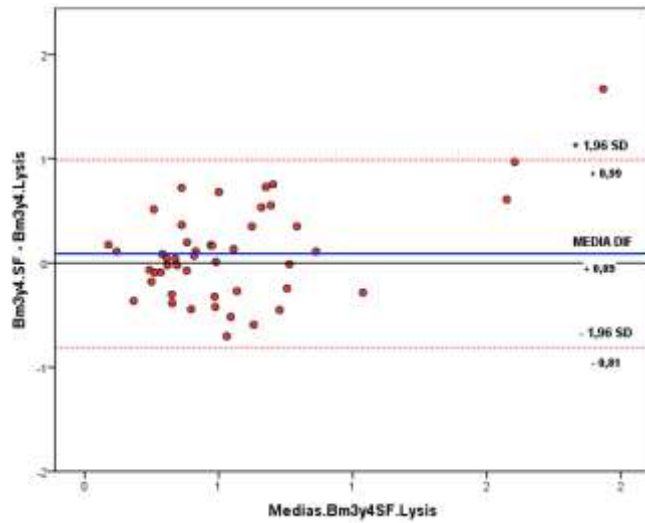
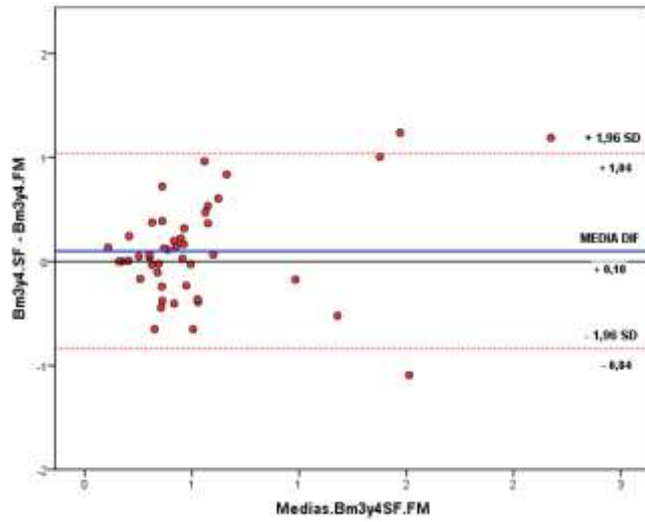


### 6. BM 2.

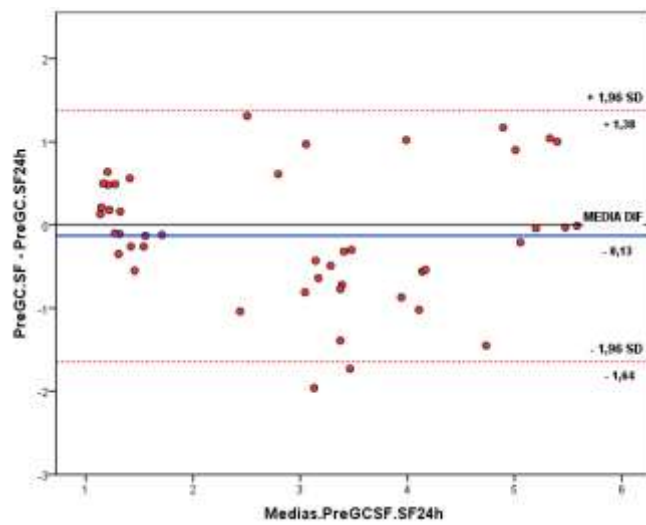
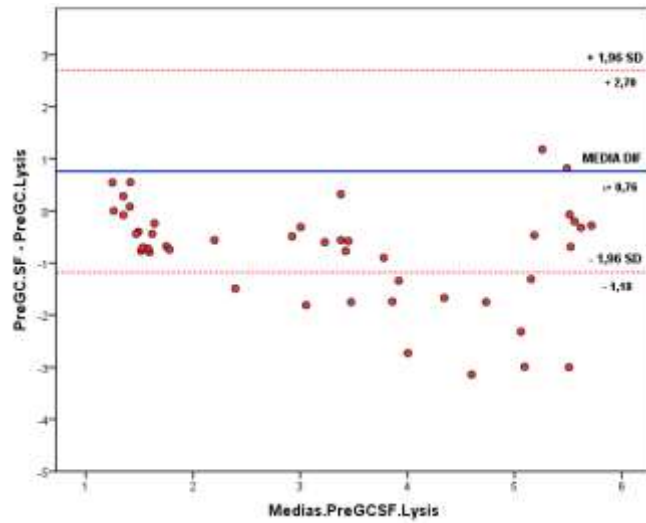
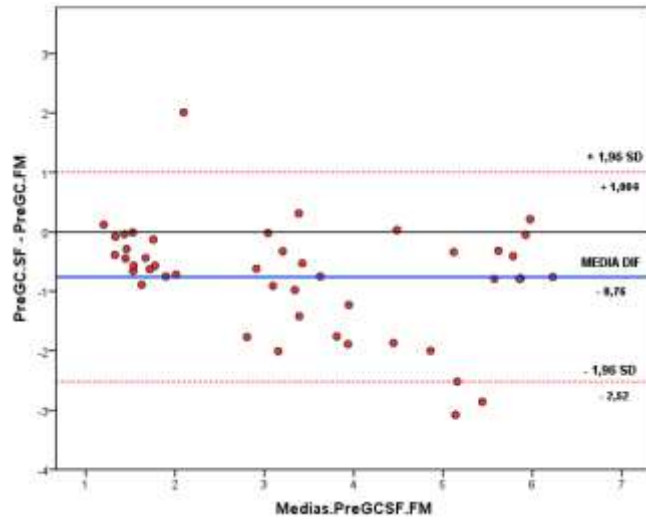




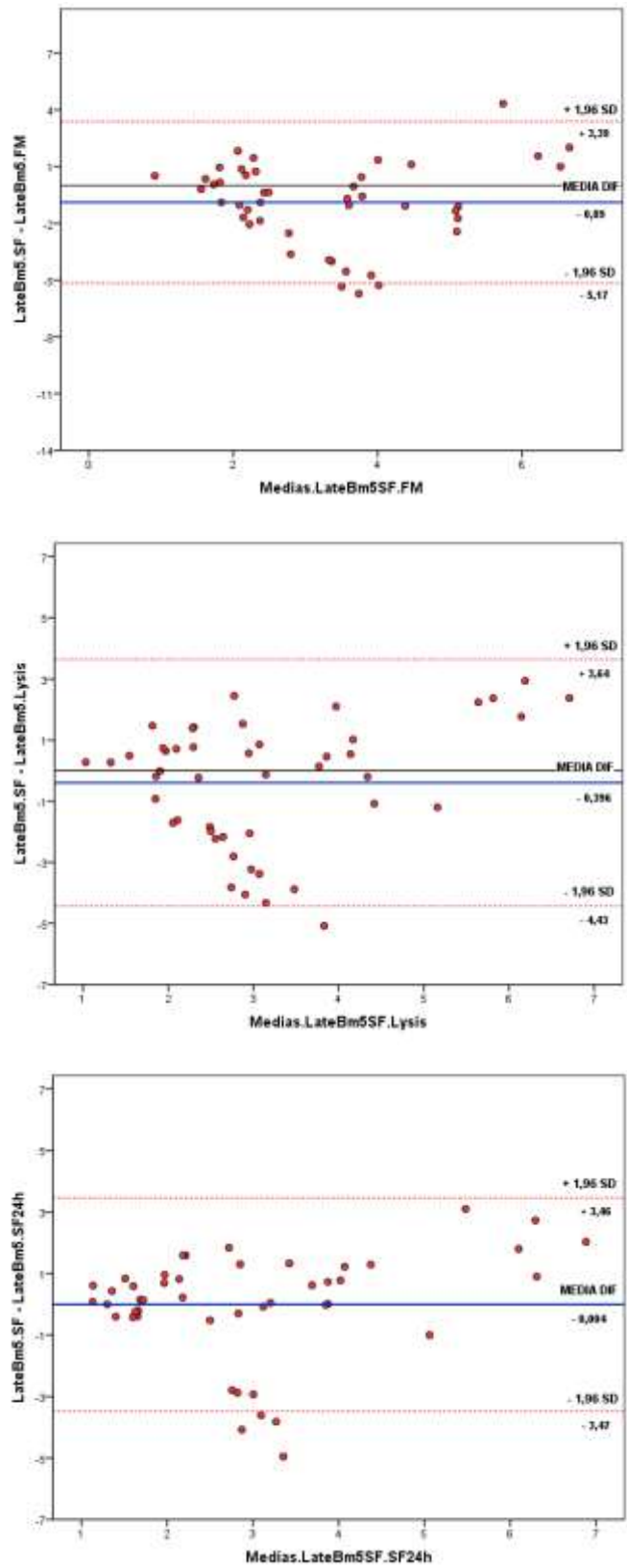
### 7. BM 3 y 4.



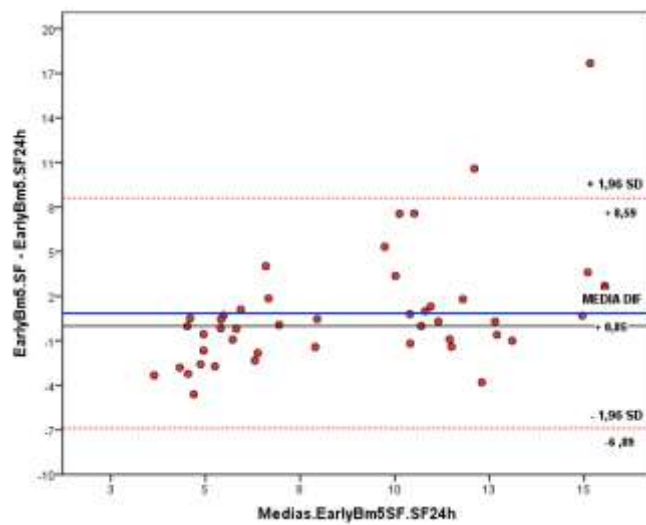
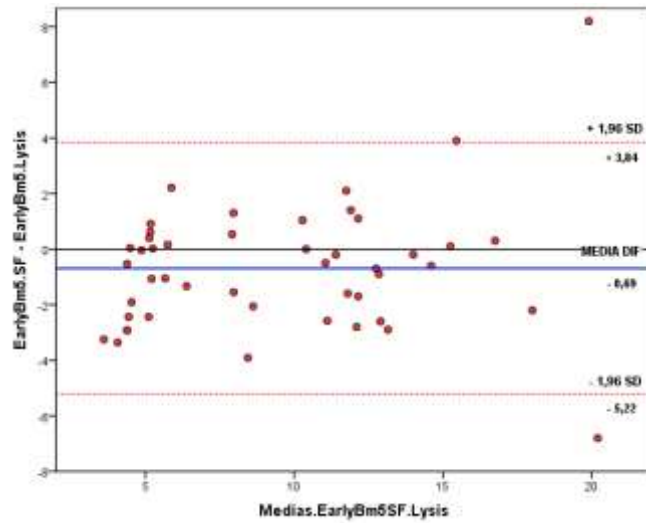
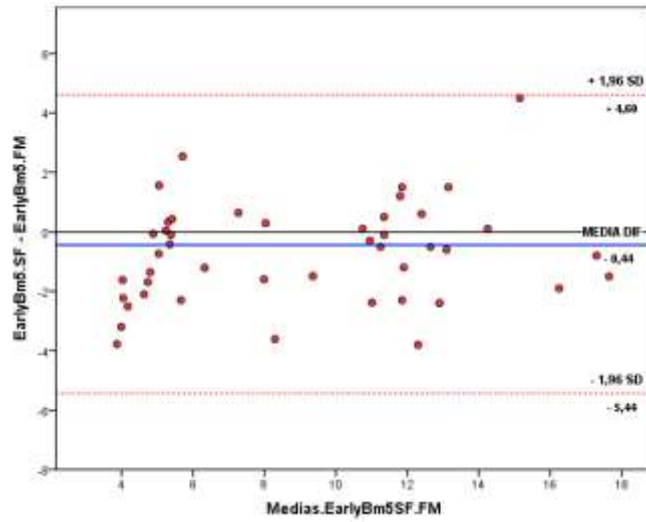
### 8. PRE GERMINAL CELL (PRE-GC).



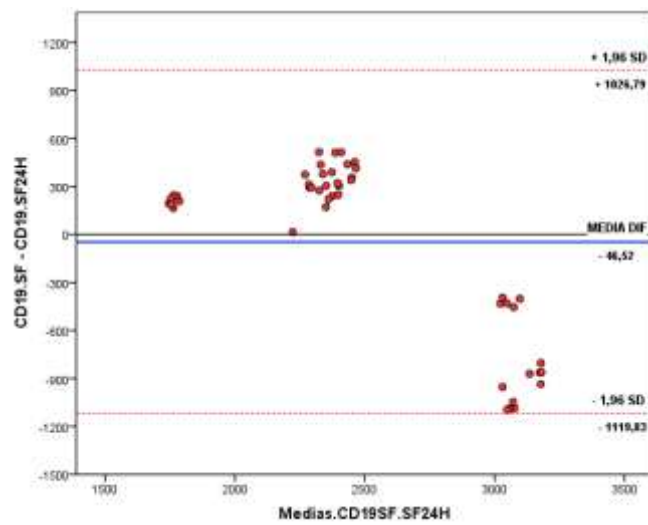
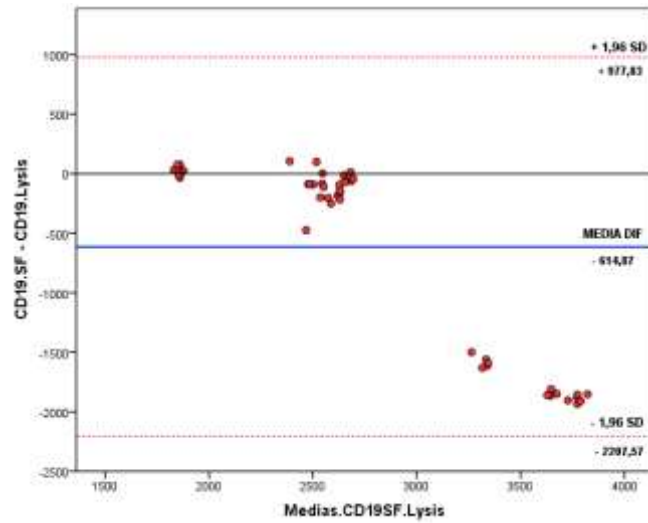
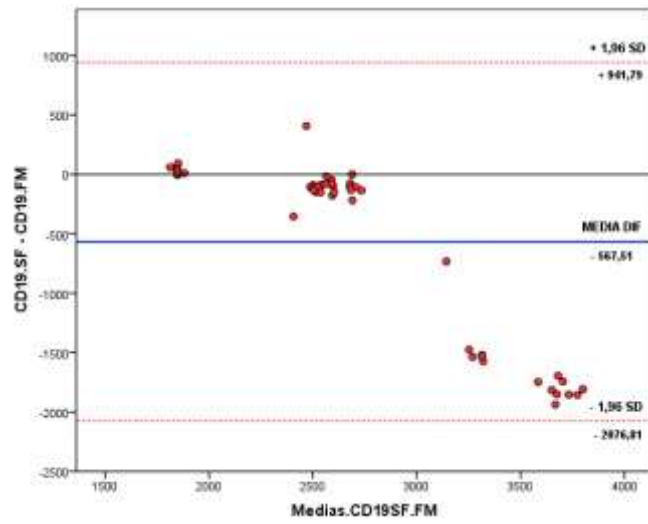
### 9. LATE BM5.



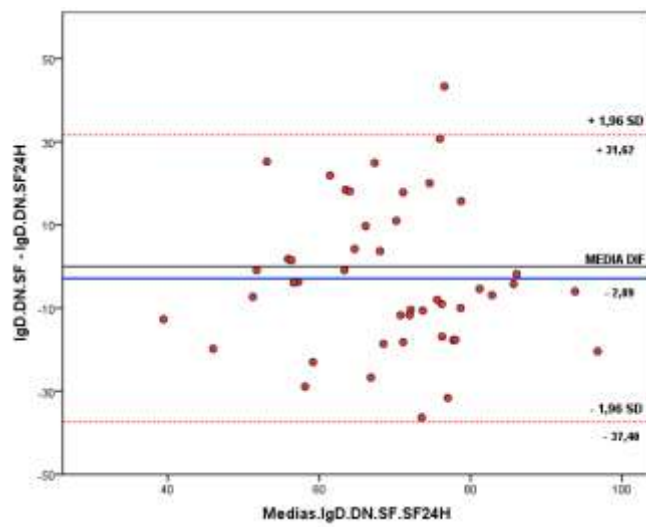
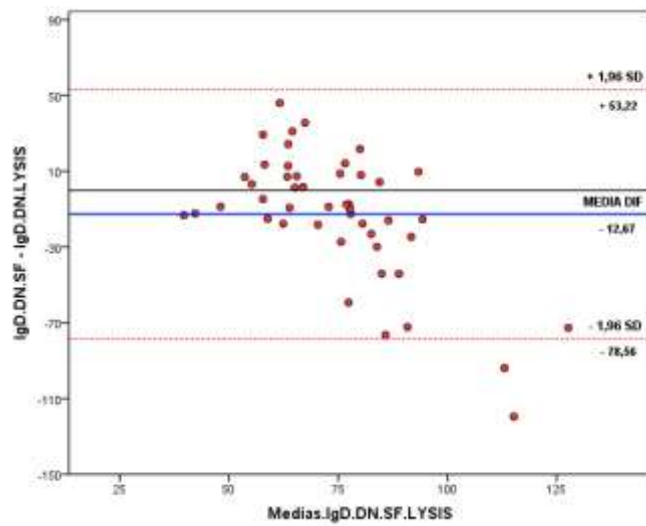
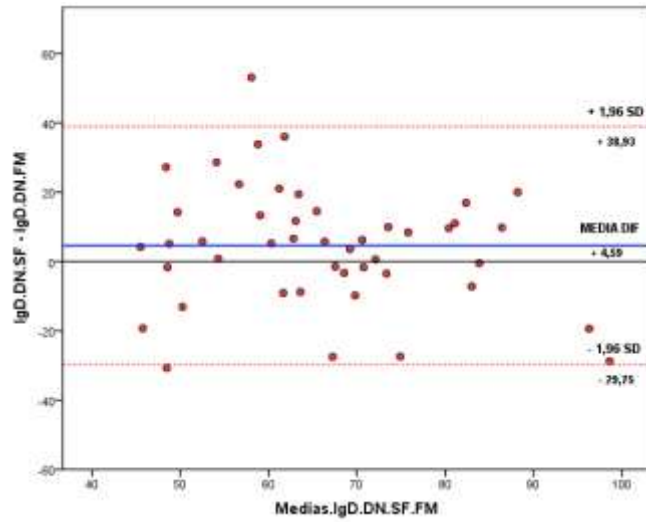
### 10. EARLY BM5.



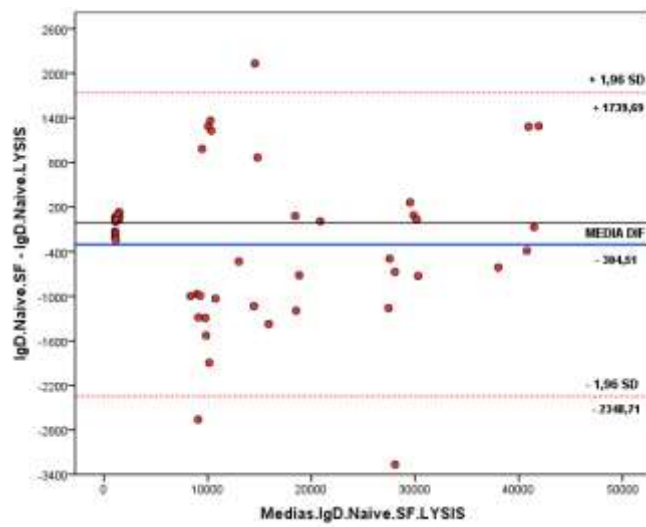
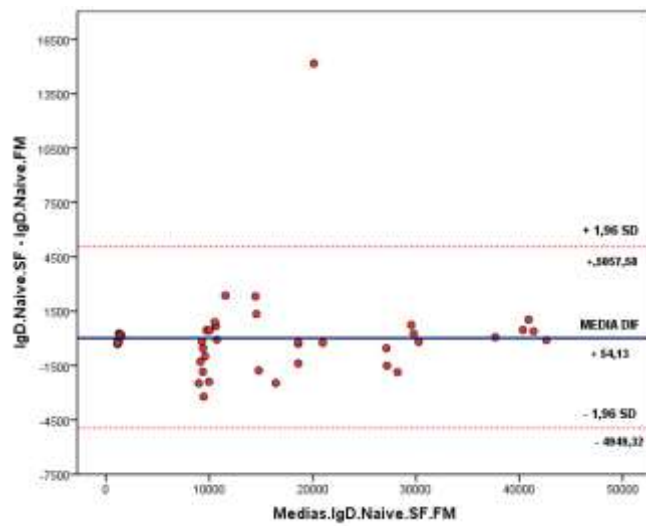
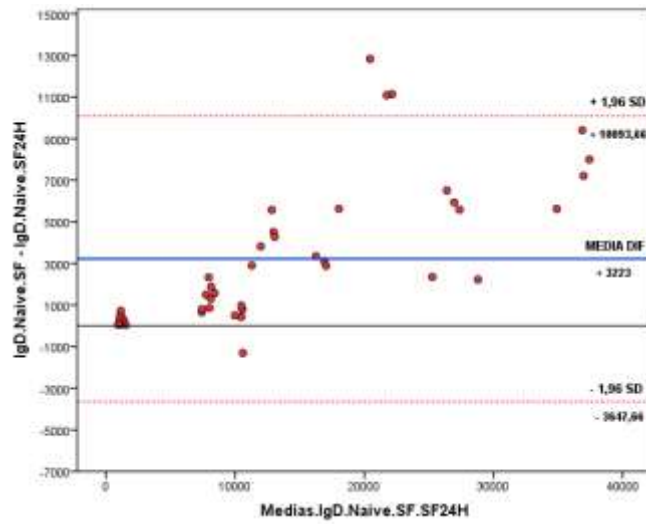
### 1. INTENSIDAD CD19.



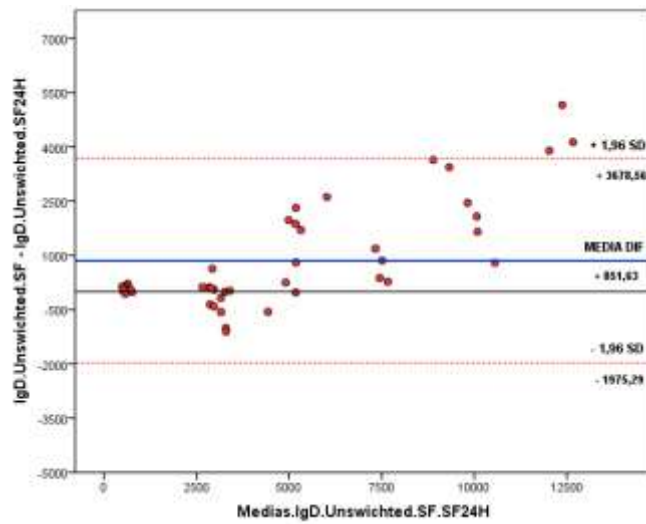
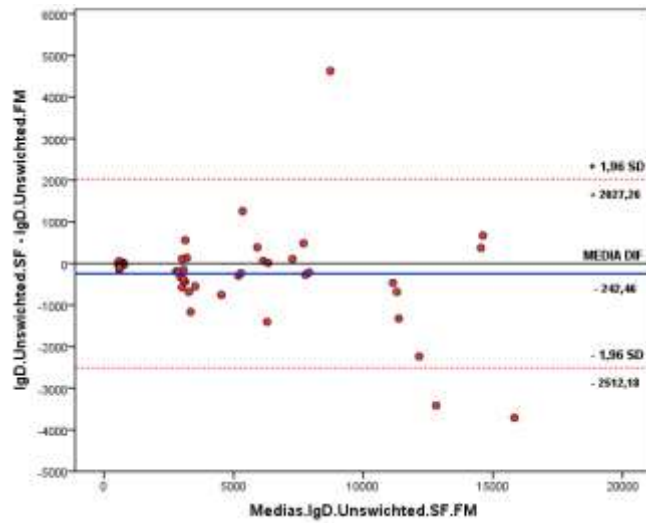
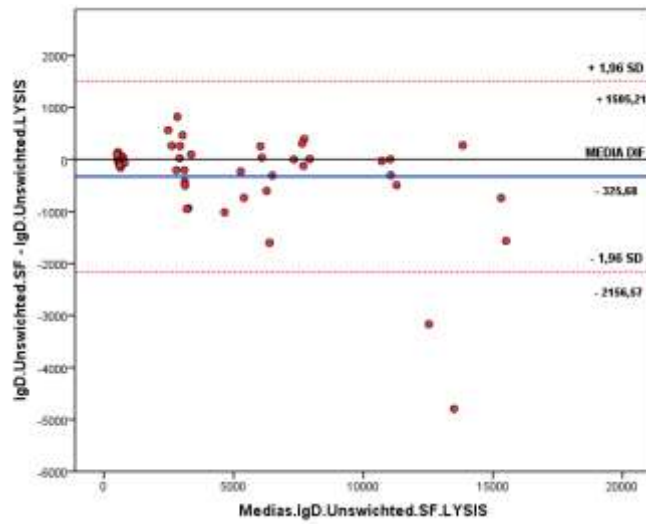
## 2. INTENSIDAD DE IgD EN DOBLE NEGATIVAS.



### 3. INTENSIDAD DE IgD EN NAIVE.

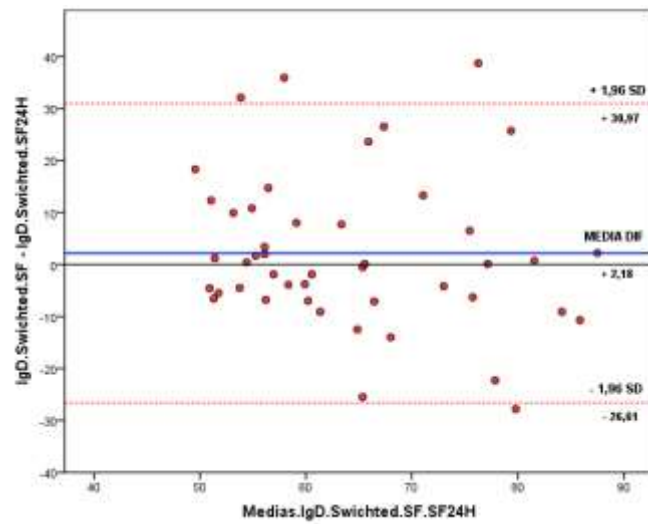
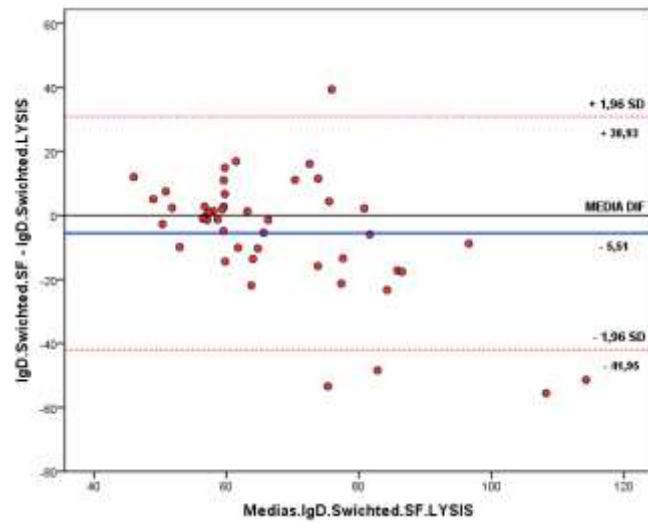
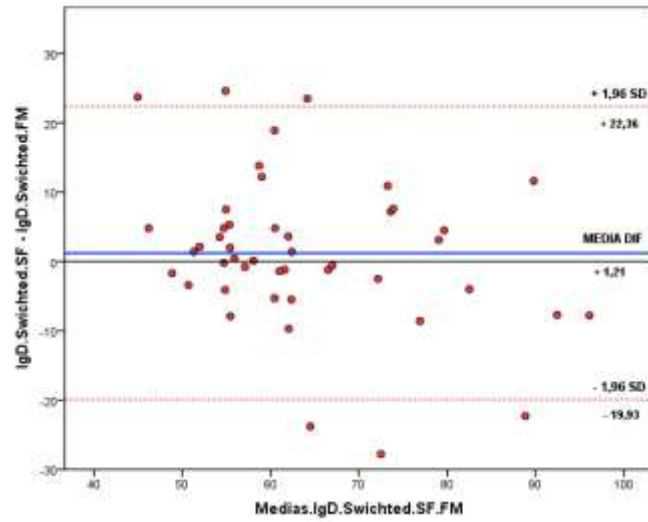


#### 4. INTENSIDAD DE IgD EN UNSWITCHED MEMORY.

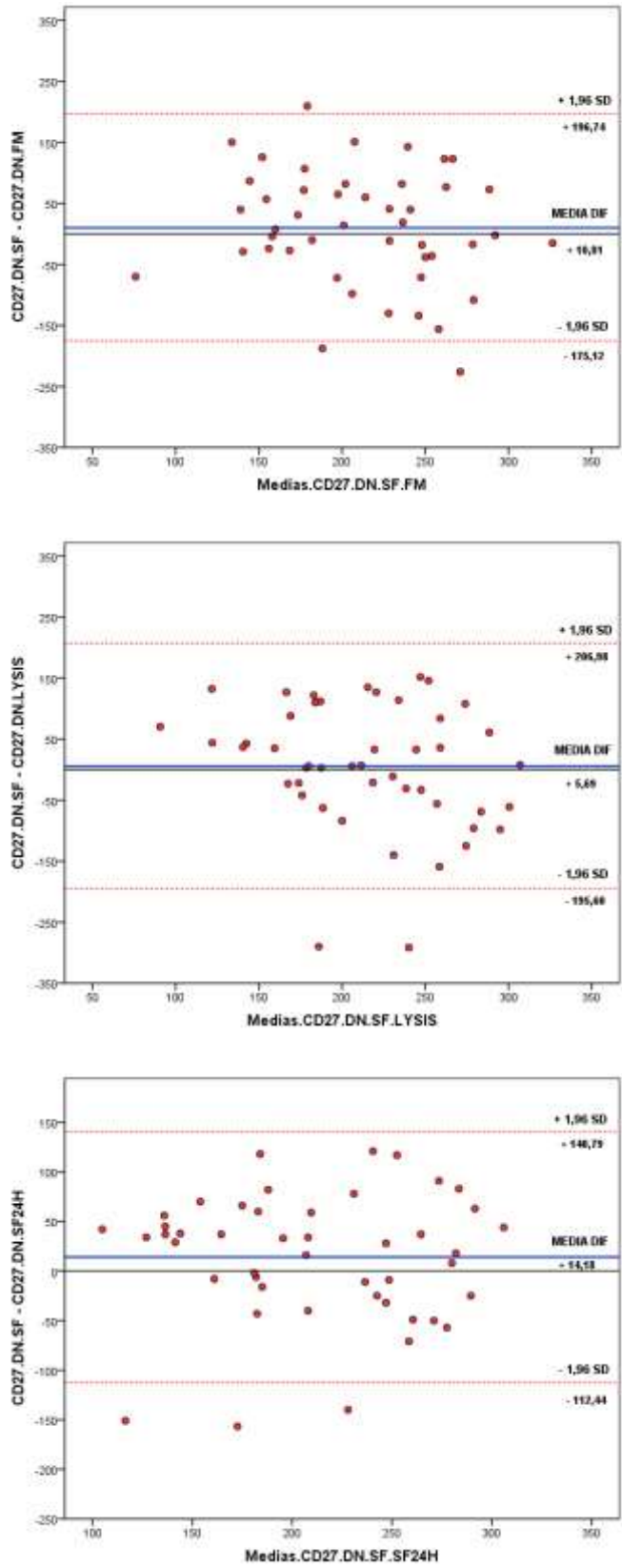




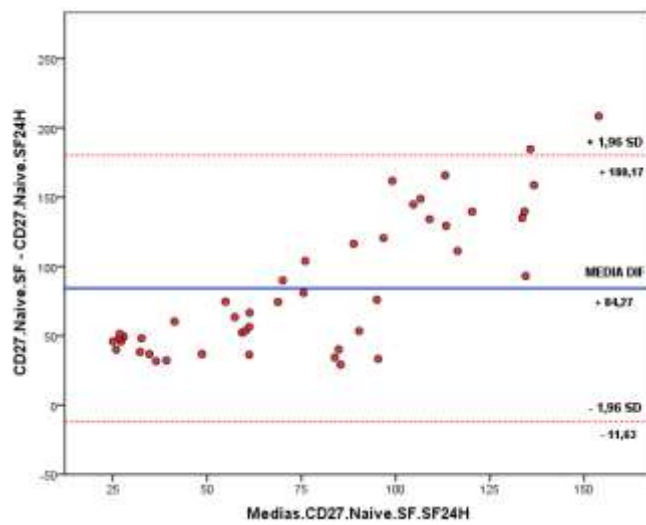
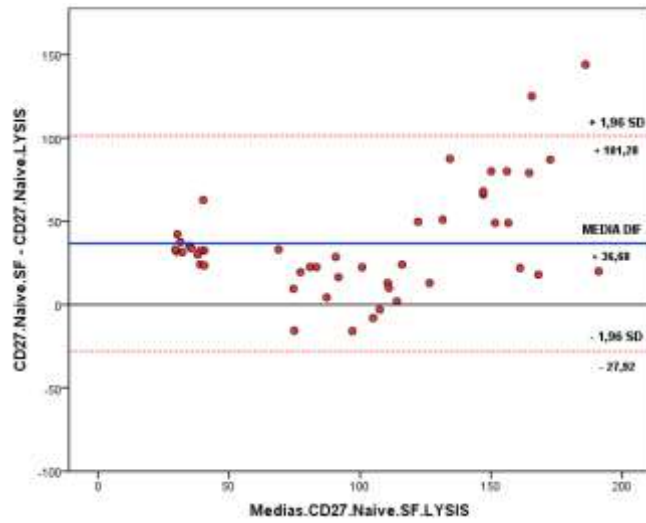
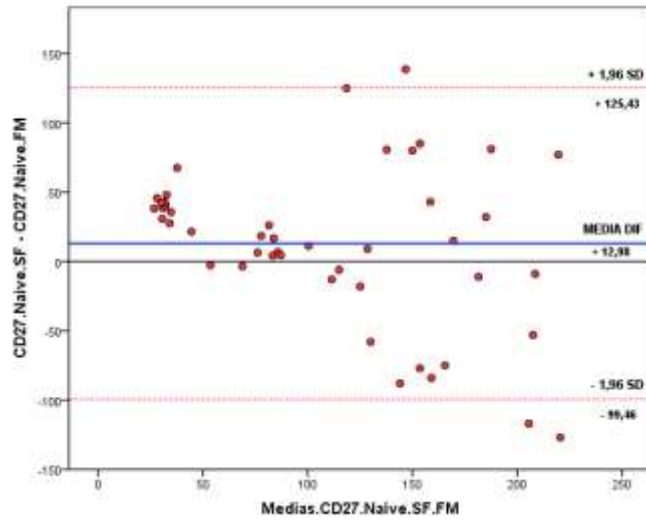
### 5. INTENSIDAD DE IgD EN SWITCHED MEMORY.



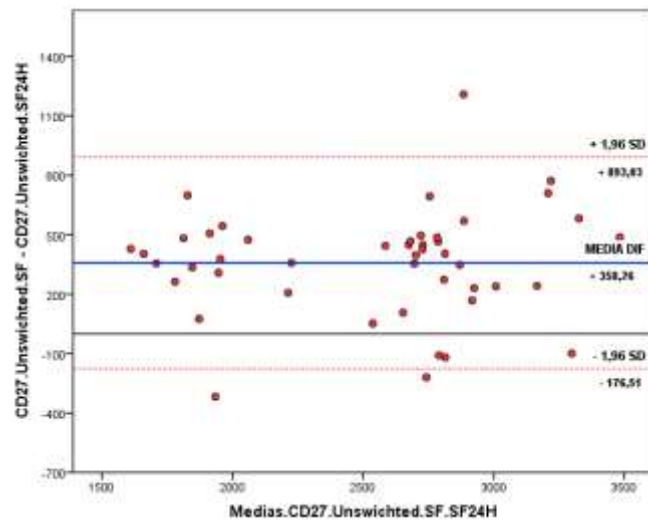
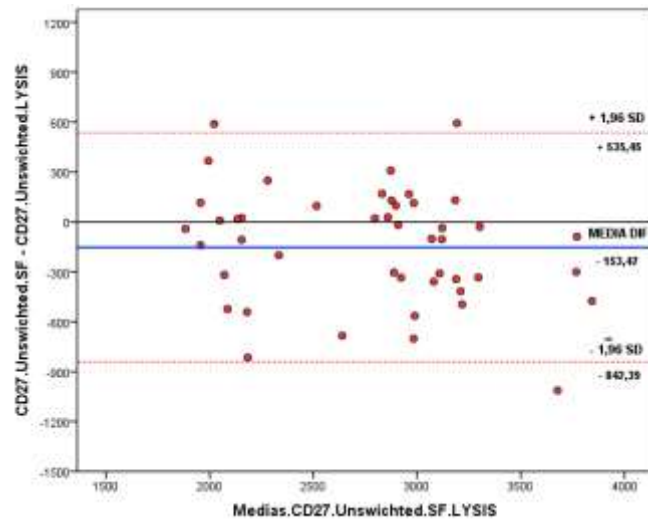
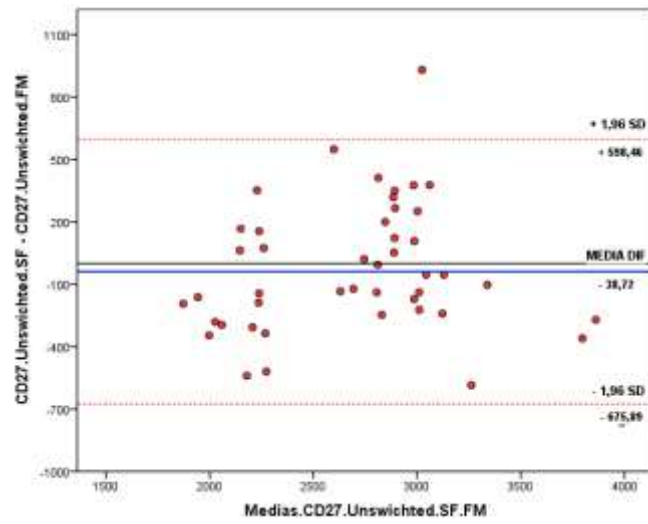
### 6. INTENSIDAD DE CD27 EN DOBLES NEGATIVAS (DN).



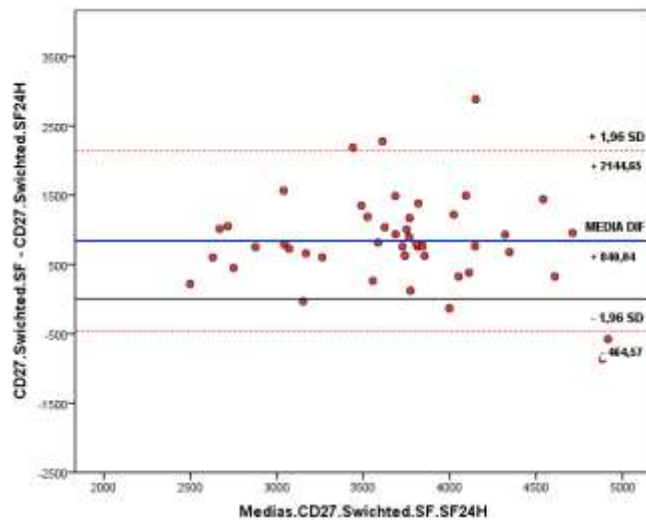
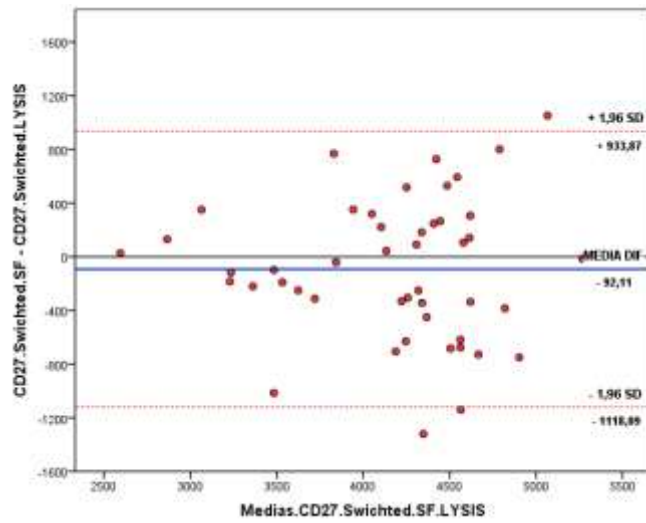
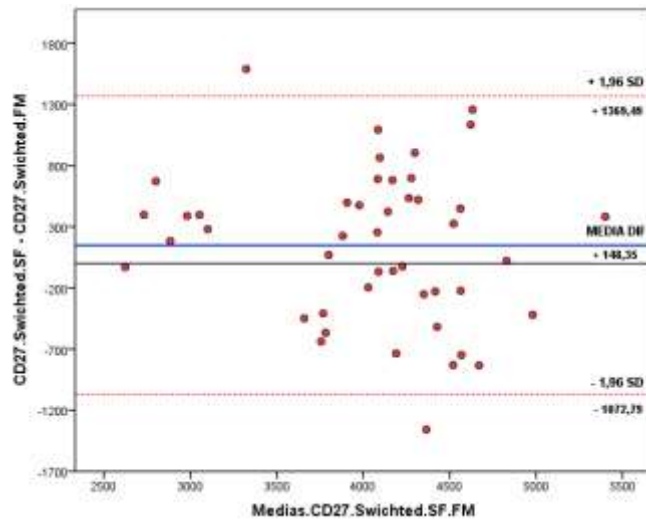
### 7. INTENSIDAD DE CD27 EN NAIVE.



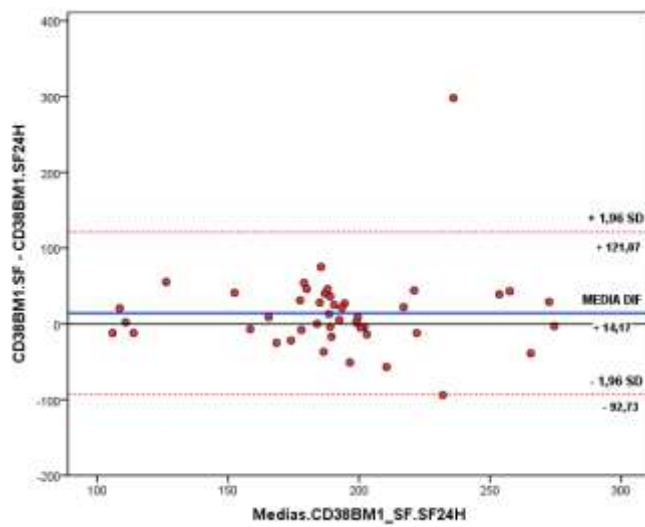
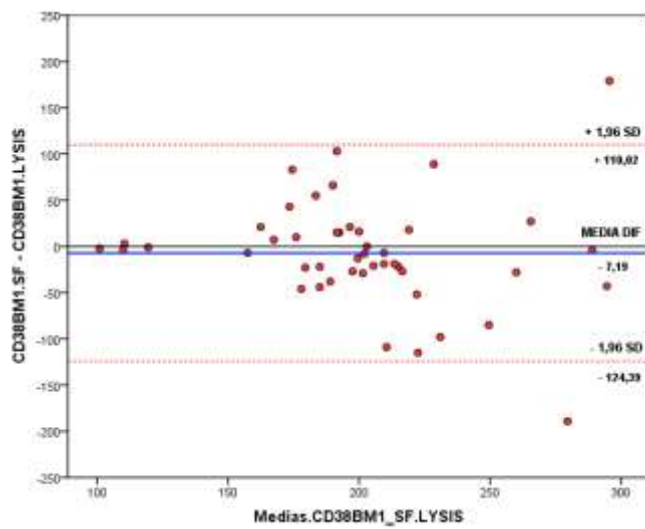
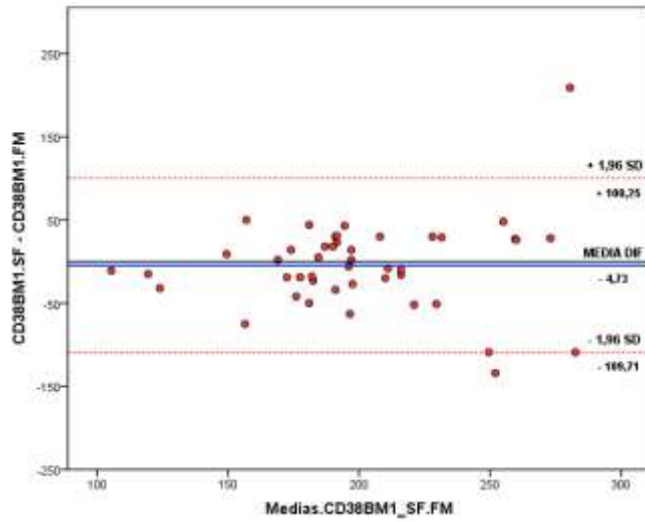
### 8. INTENSIDAD DE CD27 EN UNSWICHTED MEMORY.



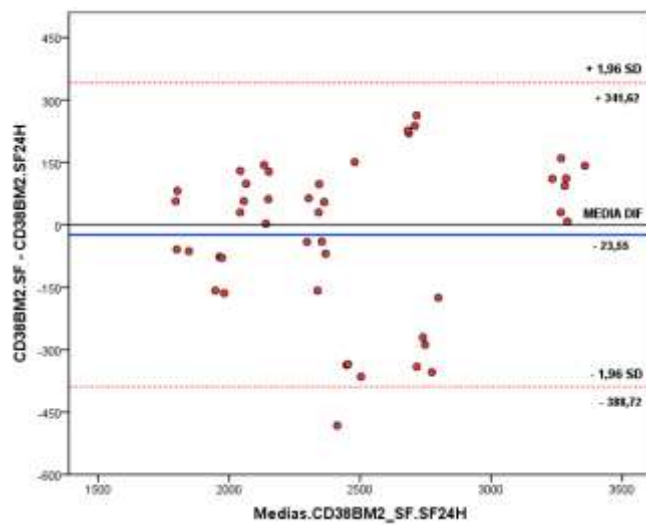
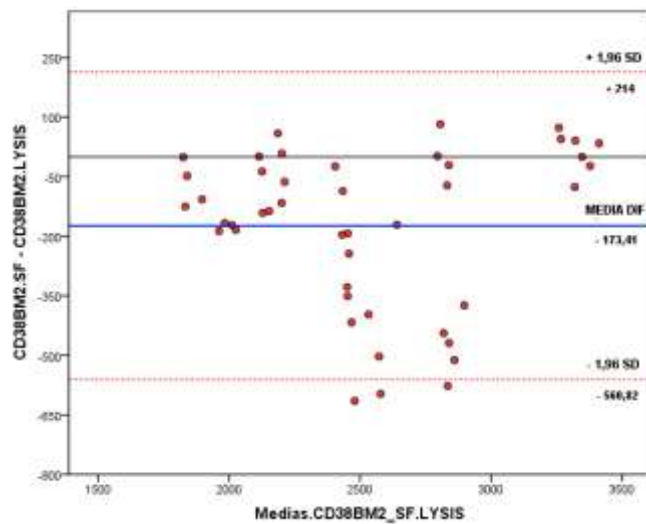
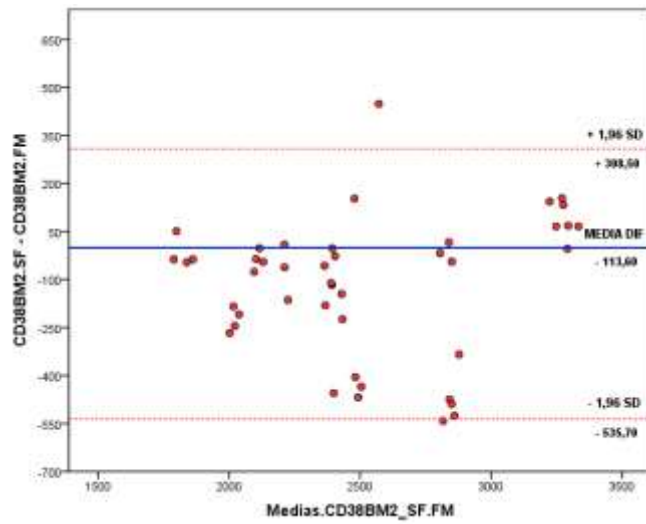
### 9. INTENSIDAD DE CD27 EN SWICHTED MEMORY.



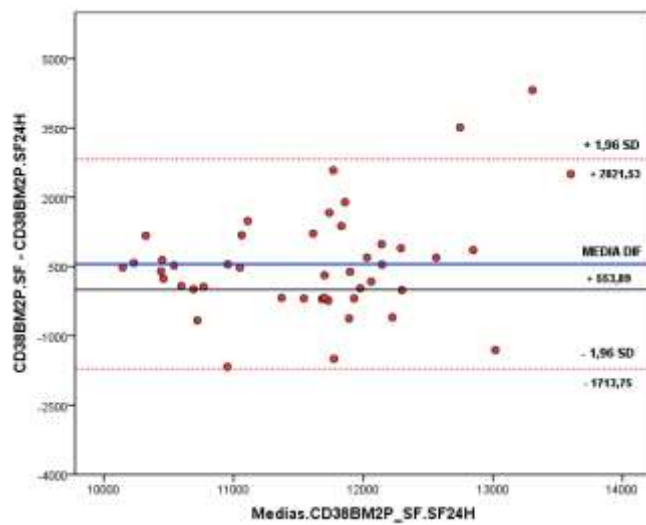
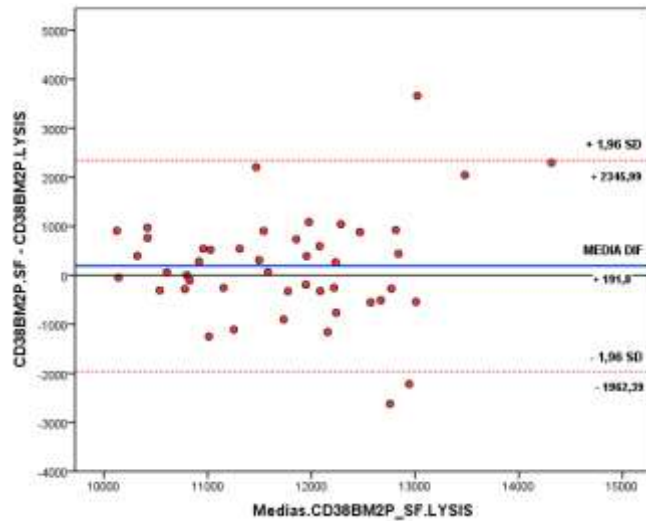
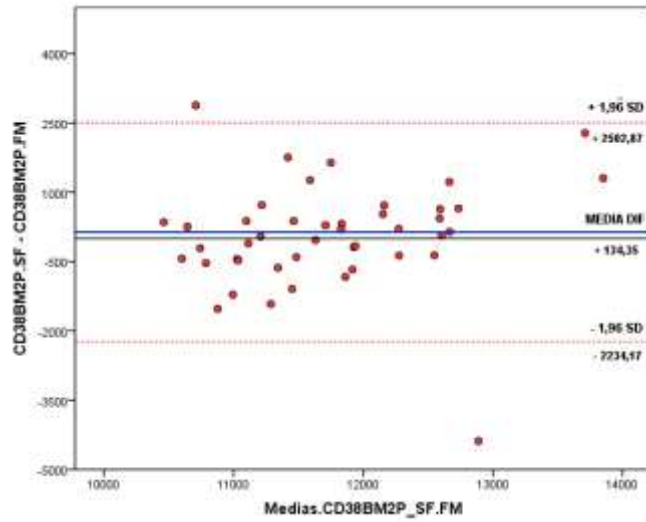
### 1. INTENSIDAD DE CD38 EN Bm1.



## 2. INTENSIDAD DE CD38 EN Bm2.

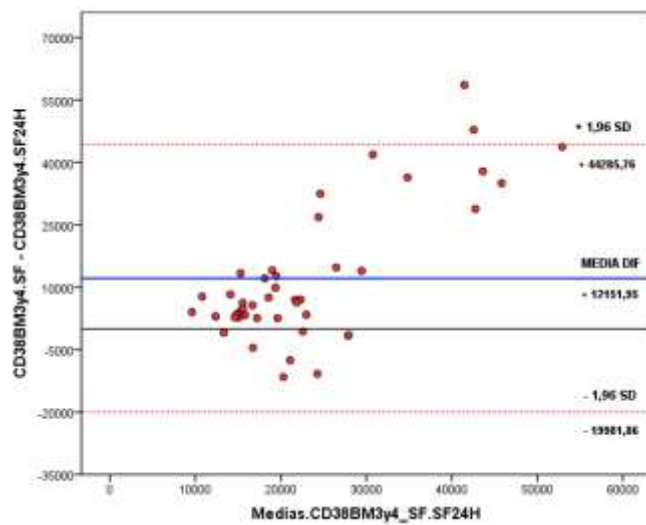
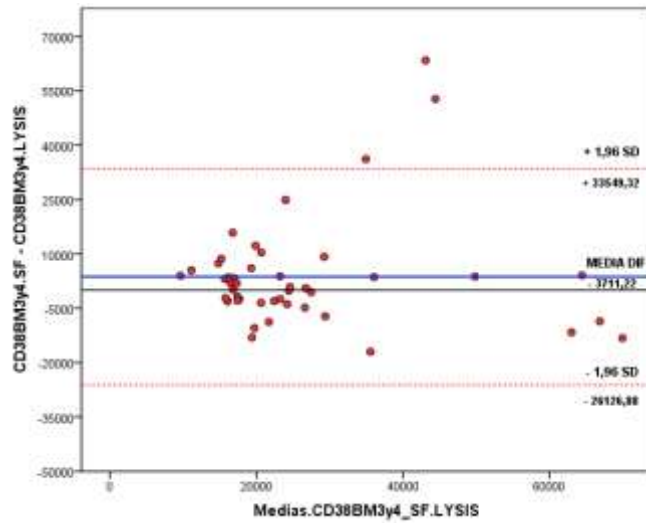
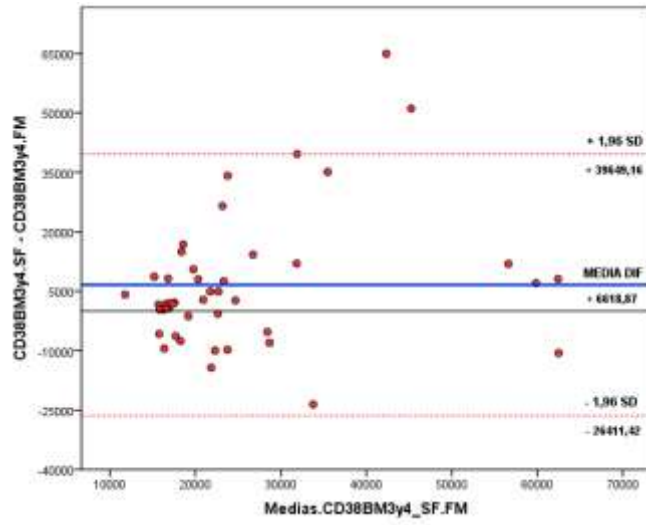


### 3. INTENSIDAD DE CD38 EN Bm2p.

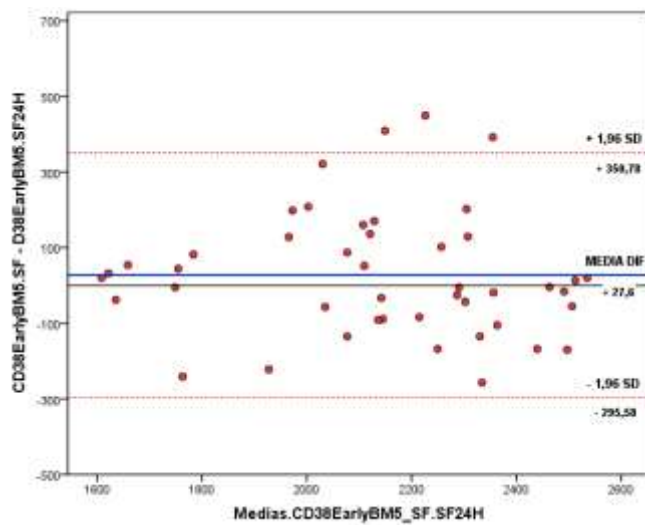
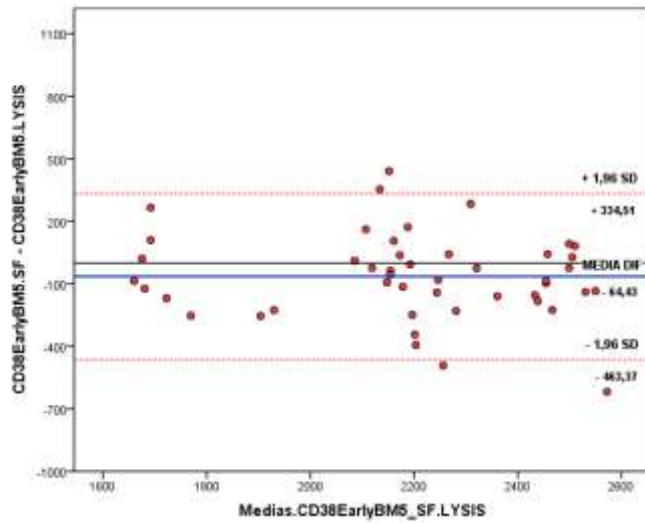
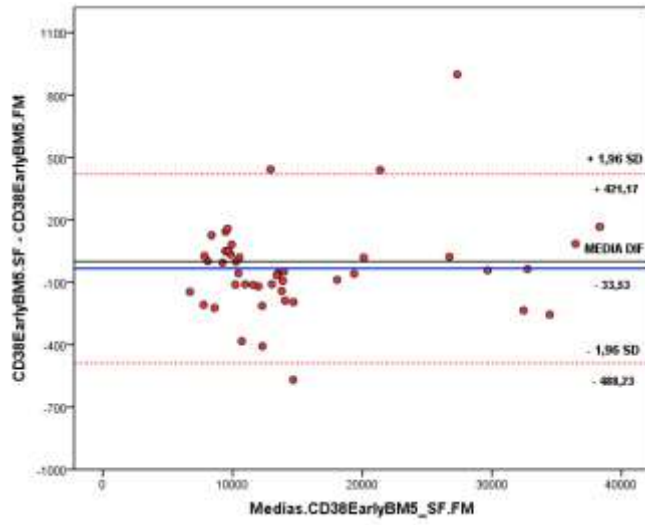




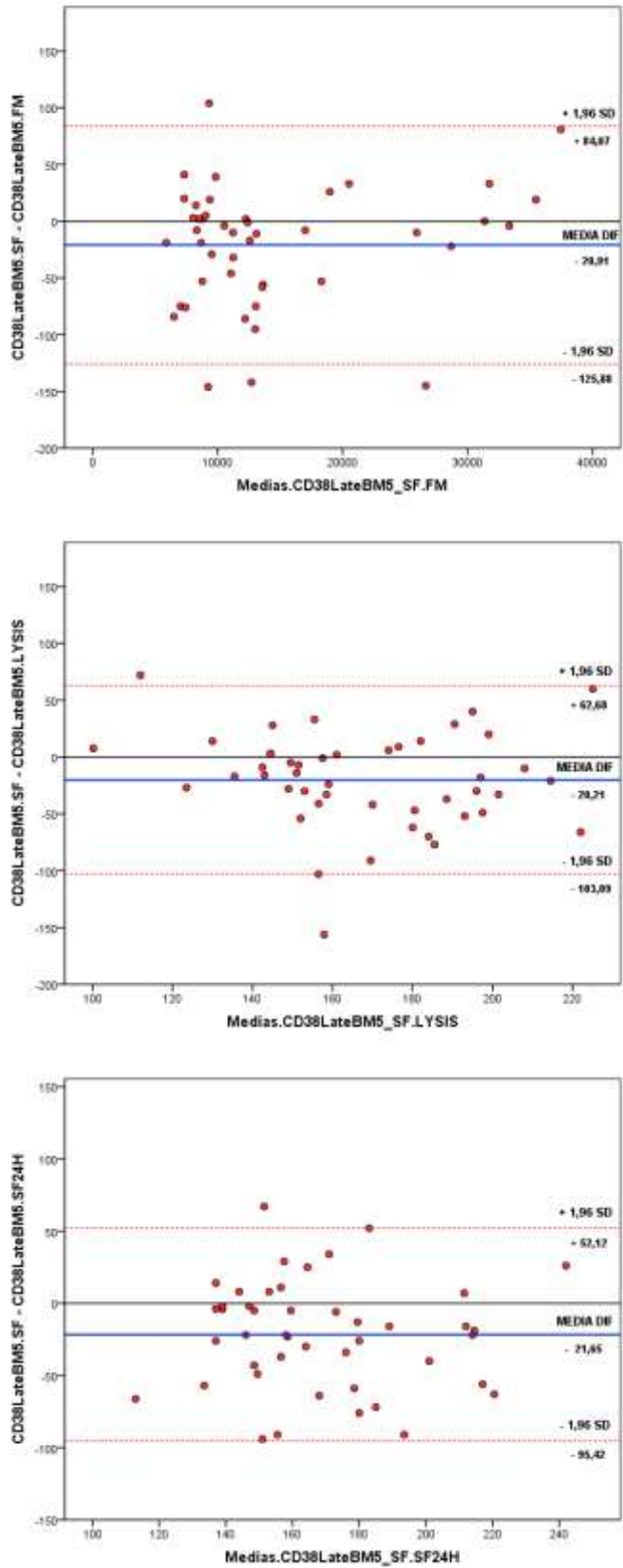
#### 4. INTENSIDAD DE CD38 EN Bm3y4.



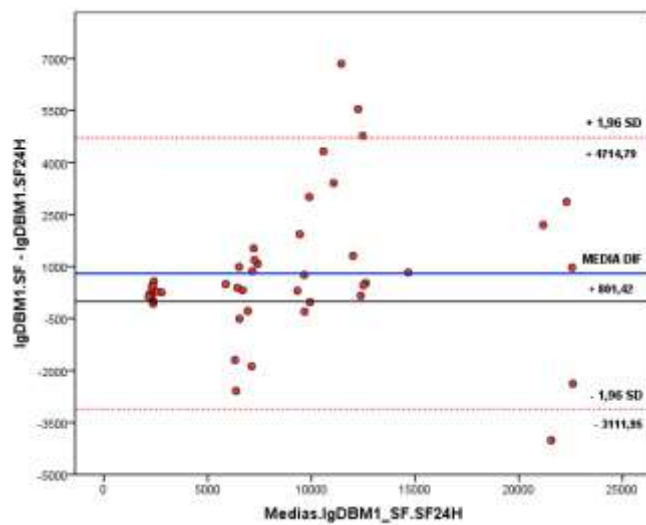
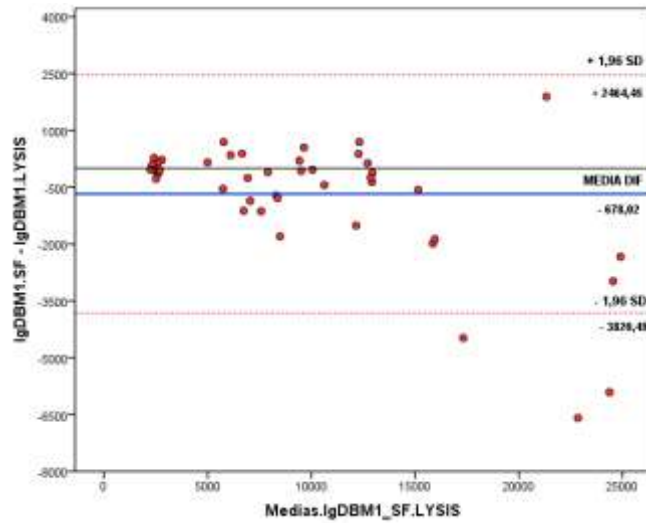
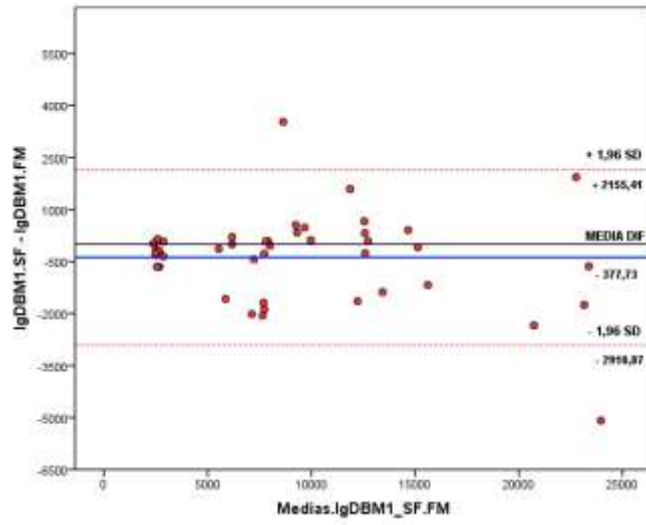
### 5. INTENSIDAD DE CD38 EN EarlyBM5.



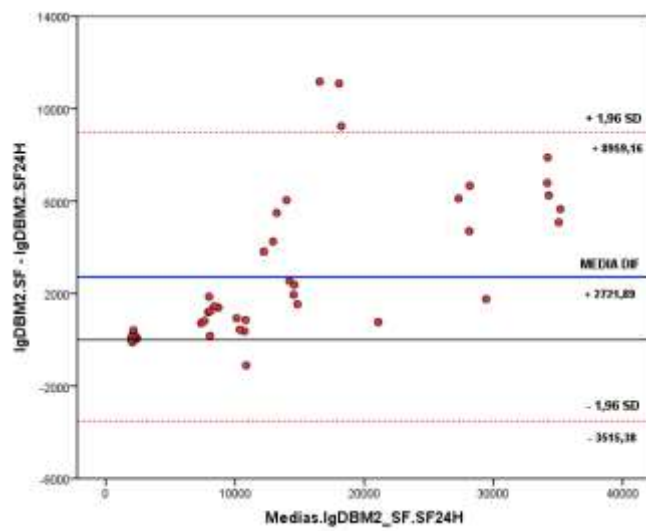
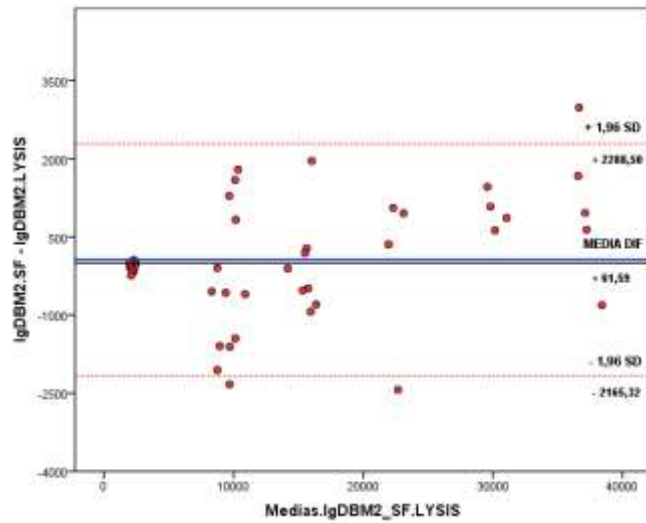
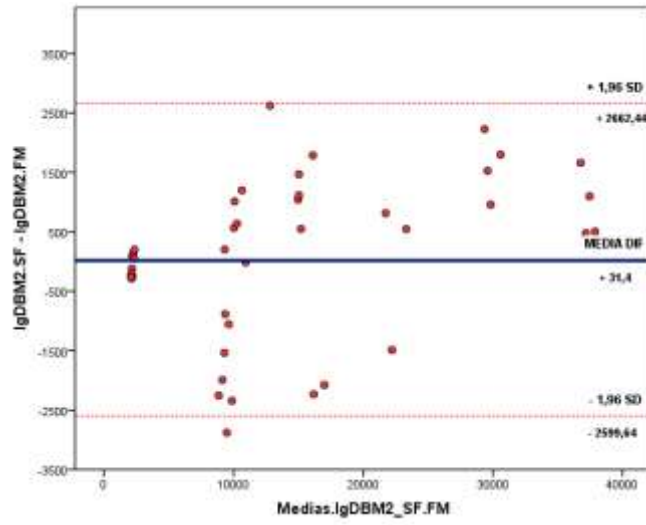
### 6. INTENSIDAD DE CD38 EN LateBM5.



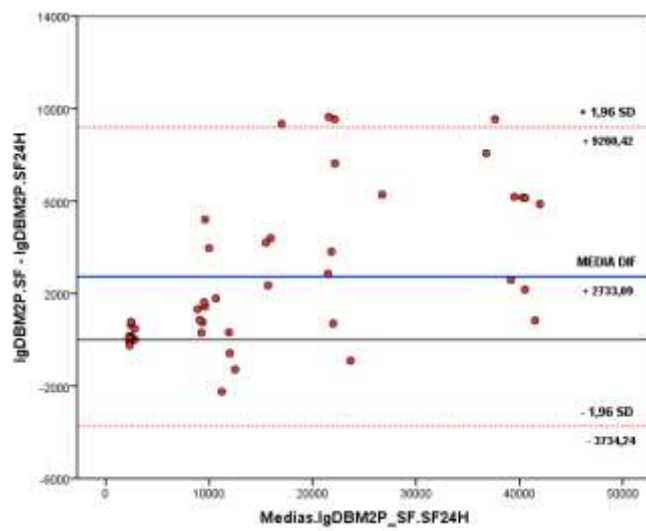
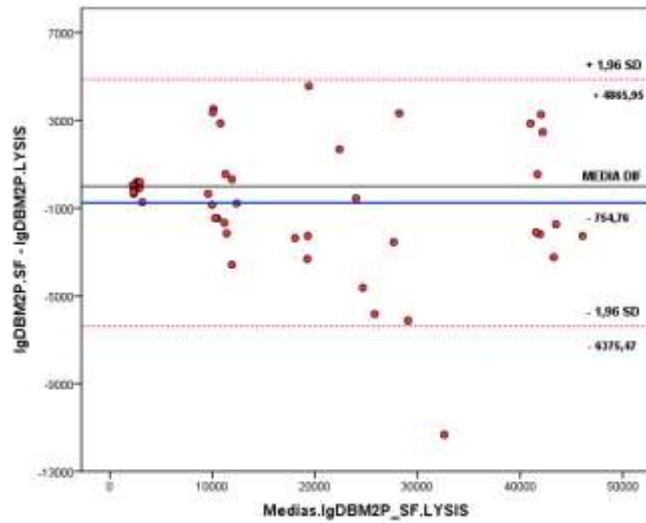
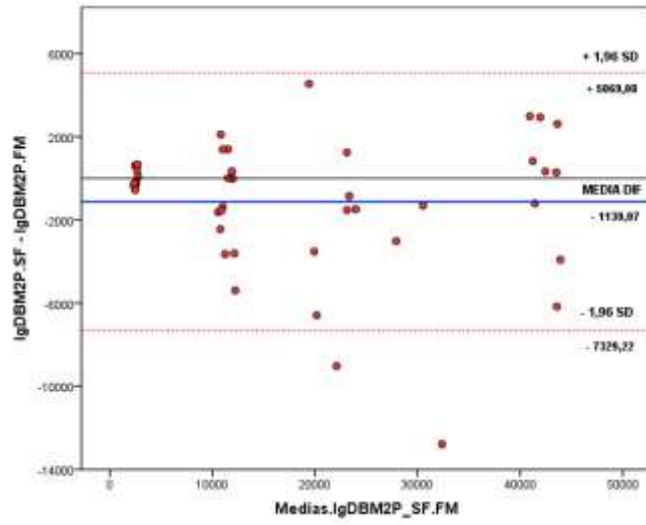
### 1. INTENSIDAD DE IgD EN BM1.



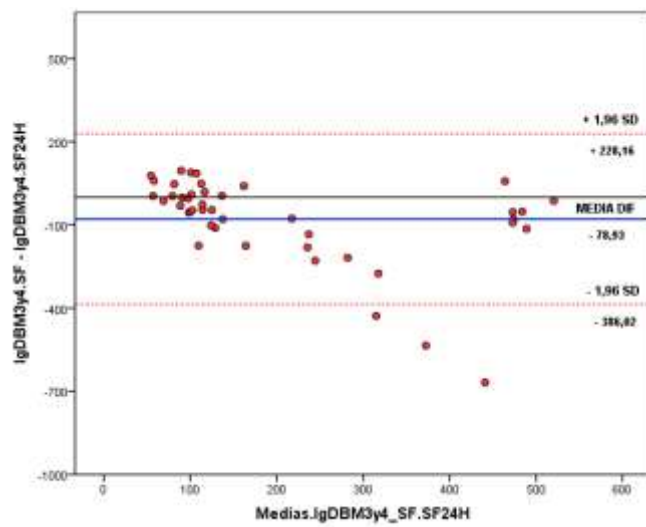
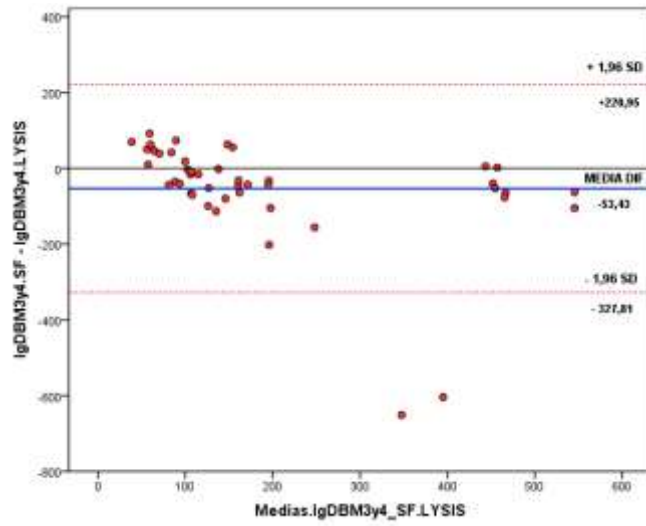
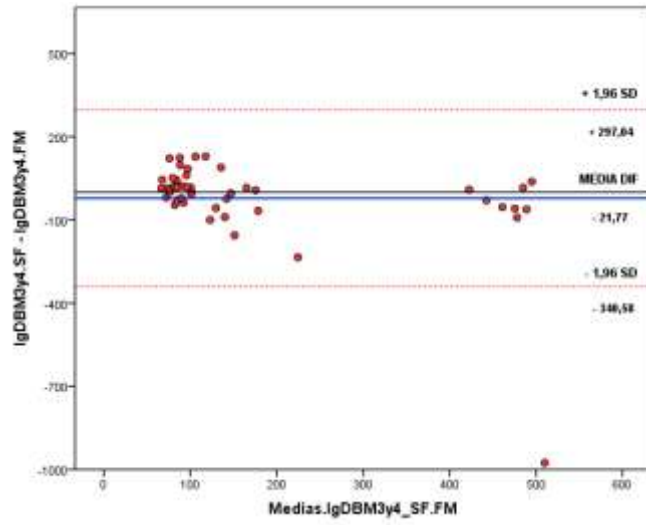
## 2. INTENSIDAD DE IgD EN BM2.



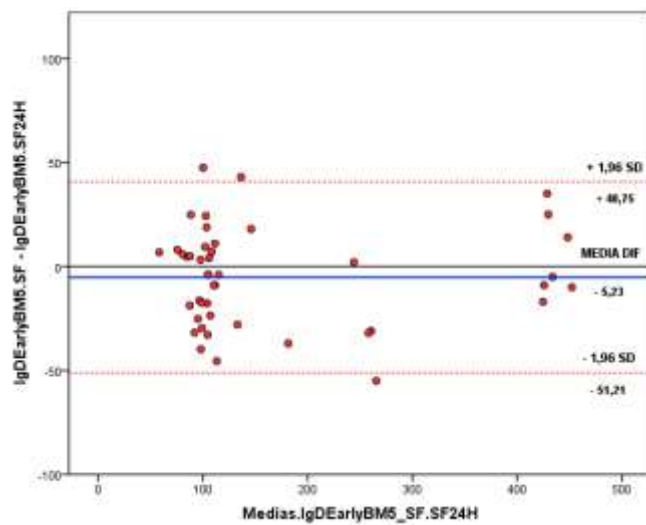
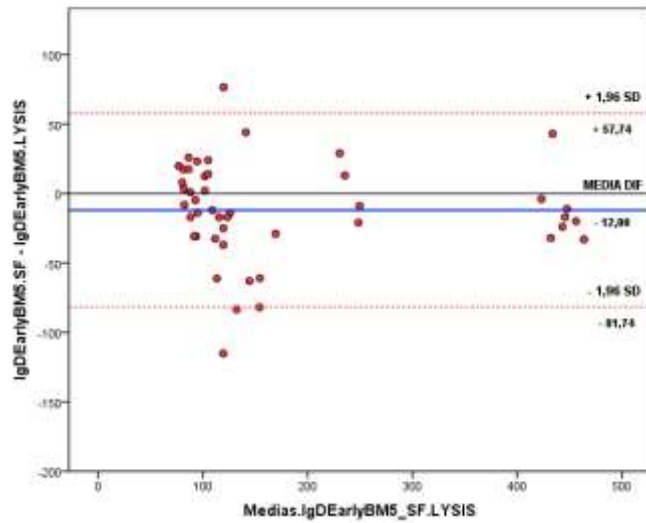
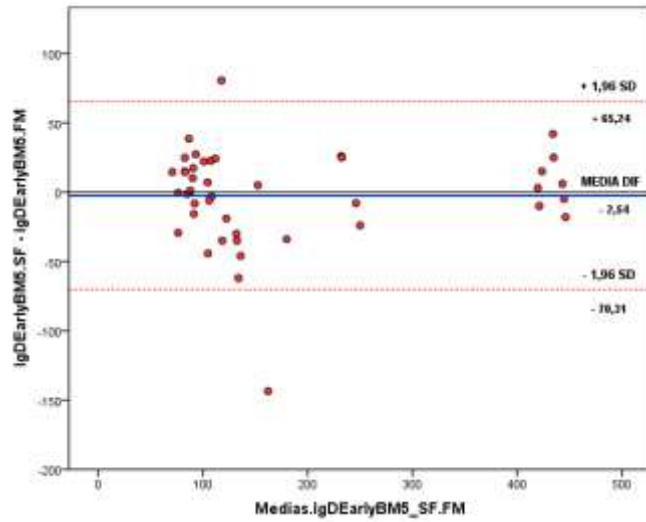
### 3. INTENSIDAD DE IgD EN BM2p.



#### 4. INTENSIDAD DE IgD EN BM3y4.

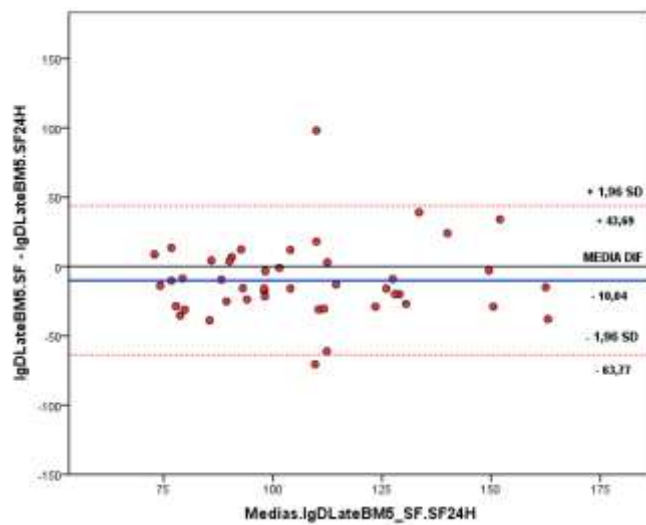
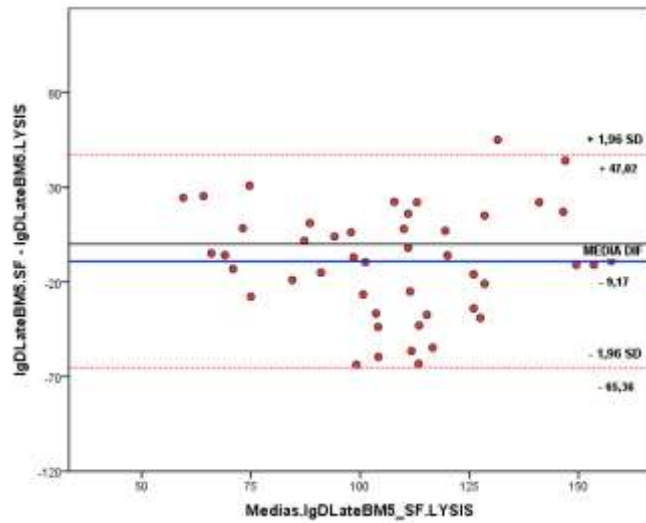
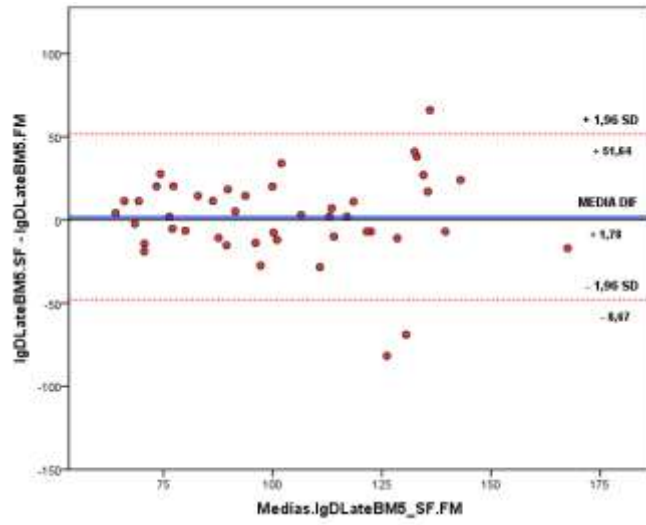


### 5. INTENSIDAD DE IgD EN EarlyBM5.





### 6. INTENSIDAD DE IgD EN LateBM5.



*Este documento se terminó de imprimir el 8 de Septiembre del 2013, día de la festividad de  
Nuestra Señora de Aguas-Santas.*