

Obtención de una versión IgG1 de ratón del rituximab para detectar la molécula CD20 humana

Obtaining a mouse IgG1 version of rituximab to detect the human CD20 molecule

Osmany Harteman Ávila¹ <http://orcid.org/0000-0002-7563-3705>

Ana Victoria Casadesus Pazos¹ <http://orcid.org/0000-0001-6905-7628>

Cristina María Mateo de Acosta del Río¹ <http://orcid.org/0000-0003-2180-9653>

Alejandro López-Requena¹ <http://orcid.org/0000-0002-6951-8321>

Katya Sosa Aguiar¹ <http://orcid.org/000-0001-7650-238X>

Denise Dorvignit Pedroso¹ <http://orcid.org/0000-0003-2844-4108>

Teresita Rodríguez Obaya¹ <http://orcid.org/0000-0002-2918-4267>

Mercedes Cedeño Arias¹ <http://orcid.org/0000-0001-7207-2132>

Tays Hernández García¹ * <http://orcid.org/0000-0001-8414-0040>

¹Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba

*DraC. Tays Hernández García (tays@cim.sld.cu)

RESUMEN

Introducción: El rituximab, anticuerpo quimérico que reconoce la molécula CD20 humana, se ha utilizado en el tratamiento de diversos trastornos linfoproliferativos de células B. Para la selección de los potenciales beneficiarios del tratamiento con rituximab se han desarrollado técnicas que, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, detectan la presencia del CD20 en los linfocitos de estos pacientes. **Objetivo:** Obtener y caracterizar un anticuerpo recombinante IgG1 de ratón específico para la molécula CD20 humana, que contenga las regiones variables del anticuerpo rituximab. **Métodos:** Para la expresión estable del anticuerpo recombinante se empleó la transducción lentiviral de células de embrión de riñón humano (HEK293). La caracterización

inmunoquímica del anticuerpo se realizó por la técnica de Western Blot y su capacidad de reconocimiento de la molécula CD20 humana se evaluó por citometría de flujo e inmunohistoquímica. **Resultados:** Se obtuvo el anticuerpo 1F5 que reconoce, por citometría de flujo, la molécula CD20 en líneas celulares humanas de origen linfoide, así como en células de sangre periférica de humanos sanos y pacientes con trastornos linfoproliferativos de células B. Sin embargo, la técnica de inmunohistoquímica solo permitió detectar con este anticuerpo la molécula CD20 en tejidos frescos, no así en los embebidos en parafina. **Conclusiones:** Este trabajo sugiere las potencialidades del uso del anticuerpo 1F5 para las mediciones de la expresión de CD20 por citometría de flujo en pacientes con leucemias B o linfomas B avanzados en fase de leucemización. Esto complementaría los estudios para la selección apropiada de pacientes para el tratamiento con el rituximab.

Palabras clave: anti-CD20; citometría de flujo; inmunohistoquímica; leucemia, linfoma no Hodgkin, rituximab.

ABSTRACT

Introduction: Rituximab, chimeric antibody specific for human CD20 molecule, has been widely used in the treatment of several B-cell lymphoproliferative disorders. For the selection of patients with the greatest potential to benefit from the therapy with rituximab, a number of techniques using monoclonal antibodies have been developed to detect the CD20 molecule.

Objective: To obtain and to characterize a mouse IgG1 recombinant antibody, specific for human CD20, that contains the variable regions of rituximab. **Methods:** The lentiviral transduction of human embryonic kidney cells (HEK293) was used for the stable expression of the recombinant antibody. The immunochemical characterization of the antibody was performed by Western Blot and the recognition of CD20 was evaluated by immunohistochemistry and flow cytometry.

Results: We generated the antibody 1F5, able to recognize by flow cytometry the CD20 molecule expressed on lymphoid human cell lines, as well as peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and patients with B-cell lymphoproliferative disorders. However, 1F5 antibody detected the CD20 molecule on fresh tissues, but not on formalin-fixed paraffin embedded tissues, by immunohistochemistry. **Conclusions:** This work suggests the potential use of 1F5 antibody for the measurement of CD20 expression by flow cytometry in patients with B-cell

leukemias or B-cell lymphomas in phase of leukemization. This could complement the studies to ensure the appropriate selection of patients for the treatment with rituximab.

Keywords: anti-CD20; flow cytometry; immunohistochemistry; leukemia, Non Hodgkin lymphoma; rituximab

Recibido: 18/12/2018

Aceptado: 12/02/2019

INTRODUCCIÓN

El uso de los anticuerpos monoclonales (AcMs) contra las células neoplásicas representa una de las estrategias inmunoterapéuticas más importantes para el tratamiento de diversos trastornos linfoproliferativos como el linfoma no Hodgkin (LNH) y la leucemia linfocítica crónica (LLC). Un ejemplo sobresaliente lo constituye el anticuerpo rituximab (Rituxan/Mabthera®), el cual es específico por la molécula CD20 humana, proteína no glicosilada expresada fundamentalmente en la superficie de los linfocitos B. ⁽¹⁾ En algunas células B tumorales, esta molécula presenta una expresión incrementada, lo que la convierte en un blanco atractivo para el diagnóstico y la terapia. Aunque se ha extendido el uso del rituximab al tratamiento de los trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis múltiple; los trastornos linfoproliferativos siguen siendo el nicho clínico más abordado hasta el momento. ^(2,3,4)

Para la selección de los pacientes oncológicos potencialmente beneficiarios del tratamiento con rituximab, se han desarrollado técnicas que, mediante el uso de AcMs, detectan la presencia de CD20 en sus linfocitos. Entre estos anticuerpos el más utilizado en inmunohistoquímica (IHQ) es el L26 (DAKO, Carpintería, USA), que reconoce un epítipo intracitoplasmático de la molécula CD20, diferente al reconocido por el rituximab, y otros anticuerpos empleados en citometría de flujo (CMF), los cuales se unen específicamente al dominio extracelular del mismo blanco. El seguimiento de la expresión de CD20 es de gran importancia, sobre todo, considerando que la

pérdida de la expresión de esta molécula en células B neoplásicas podría ser unas de las causas de ausencia de respuesta al tratamiento con rituximab. ⁽⁵⁾

Por este motivo, disponer de un anticuerpo para la detección de la molécula CD20 que comparta el mismo epítipo del rituximab sería ventajoso para una selección óptima de los pacientes que pudieran beneficiarse realmente con este tratamiento. En el presente trabajo se propuso la generación de un anticuerpo de ratón con idéntica especificidad epitópica que el rituximab, para la evaluación de la expresión de CD20 en células B malignas. De esta manera, se diseñó una variante recombinante de rituximab con idénticas regiones variables y regiones constantes $\gamma 1/kappa$ de ratón, empleando la tecnología de transducción lentiviral para su expresión.

MÉTODOS

Líneas celulares

Para la expresión estable del anticuerpo recombinante se emplearon células HEK293. La expresión transitoria y la obtención de partículas transductoras lentivirales se hicieron en HEK293T. Estas células y las líneas de linfoma de Burkitt, Ramos, Raji y Daudi, así como la línea de linfoma de células T Jurkat se obtuvieron de la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC, sigla del inglés *American Type Culture Collection*, Rockville, MD). Todas las células se cultivaron a 37°C, en atmósfera de 5 % de CO₂. El cultivo de los transfectomas y las células HEK293, HEK293T, Raji y Daudi se realizó en medio DMEM-F12 (Paisley, Reino Unido). Las células Ramos y Jurkat se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco).

AcMs

Se emplearon los AcMs: rituximab (Roche, Basilea, Suiza); el AcM humanizado R3h (IgG1/ κ , humanas) que reconoce específicamente el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano; el AcM 1E10 (IgG1/ κ , de ratón) que es un anti-idiotipo del AcM P3 (anti-gangliósidos N-glicolilados); y el AcM 4G9 (IgG1/ κ , de ratón) que es un anti-idiotipo del AcM 14F7 (anti-gangliósido GM3).

Construcciones genéticas para la expresión del anticuerpo recombinante anti-CD20

A partir de los constructos VKCKRx-pcDNA3 neo y VHCHRx-pcDNA3 neo se aislaron por digestión enzimática *EcoRV/XbaI* los genes de las cadenas ligera y pesada del AcM recombinante anti-CD20, de ratón. Estos fragmentos se insertaron en el vector pLW-CMV, para obtener las construcciones pLW-CMV-VKCKRx y pLW-CMV-VHCHRx. La inserción de las bandas se identificó por restricción enzimática y se comprobó por secuenciación automática, empleando el servicio de la empresa Macrogen (Geumchun-gu, Seúl, Corea del Sur).

Transducción lentiviral

Para la obtención de las partículas transductoras se usaron como células empaquetadoras las HEK293T, las cuales se transfectaron simultáneamente con los tres plásmidos auxiliares pLPI, pLPII y pLP/VSV-G y el plásmido de transferencia pLW-CMV-VKCKRx, portador del gen que codifica la cadena ligera, o el pLW-CMV-VHCHRx, portador del gen de la cadena pesada. Las partículas transductoras se cuantificaron mediante el uso de un estuche comercial DAVIHp24, que detecta la molécula p24, del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (LISIDA, La Habana, Cuba).

La transducción se hizo sobre células HEK293, siguiendo un protocolo descrito anteriormente para la generación cepas de CHO-K1 secretoras de anticuerpos recombinantes.⁽⁶⁾ La expresión del AcM se evaluó en el sobrenadante de cultivo a las 72 h post-transducción, mediante un ELISA de detección de inmunoglobulinas de ratón y la población celular se fragmentó y sembró en una placa de 96 pozos. Doce días después se evaluaron los sobrenadantes para determinar la presencia de inmunoglobulinas de ratón. Se seleccionaron los grupos de células de mayor expresión y se transfirieron a placas de 24 pozos, donde se incubaron por 10 días. Entonces, se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de inmunoglobulinas recombinantes. Para lograr la homogeneidad de la población, las células transducidas se aislaron dos veces por dilución limitante.

Purificación de anticuerpos

El AcM recombinante de ratón se purificó por cromatografía de afinidad en matriz de proteína A-Sefarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ) a partir de sobrenadante de cultivo de las células transducidas. La columna se equilibró con solución tampón glicina 0.1 M, NaCl 3M, pH 8,9. Se aplicó el sobrenadante y posteriormente se lavó con la solución anterior. El AcM se eluyó con una solución de ácido cítrico 0,1 M, pH 4,5 y se dializó durante 24 horas en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF). La concentración se determinó por absorbancia a 280 nm.

Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles desnaturalizantes se prepararon a una concentración final de poliacrilamida de 7,5 % y 12,5 %, para condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente. Se aplicaron 10 µg de anticuerpo purificado en cada pocillo y las bandas correspondientes a los productos resueltos se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomasie (Sigma-Aldrich, Munich, Germany).

Acoplamiento de los anticuerpos a biotina

La solución de anticuerpo a 1 mg/mL se incubó con 100 µg/mL de biotina N-hidroxisuccinimida (Sigma-Aldrich), en tampón borato (0,1 M, pH 8,8) por 4 h, a temperatura ambiente y en la oscuridad. La reacción se detuvo con la adición de 20 µg/mL de NH₄Cl 1 M. A continuación, las soluciones se dializaron contra solución salina tampón fosfato (SSTF).

Ensayos de CMF

En todos los ensayos de CMF los conjugados se usaron a las concentraciones sugeridas por los fabricantes. Los análisis se llevaron a cabo empleando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Las muestras se caracterizaron en cuanto a la intensidad de fluorescencia emitida por los fluoróforos y en cuanto a la granulosis y al tamaño de las células. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa FlowJo versión 5.7.2. En cada medición se adquirieron 10⁴ células. Los experimentos se repitieron tres veces.

Aislamiento de las células mononucleares periféricas (CMP) de sangre humana

La sangre humana utilizada se obtuvo del Banco de Sangre del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ, La Habana, Cuba) (donante sano) o de pacientes diagnosticados con LNH. Se colectaron 10 mL de sangre en tubos BD Vacutainer™ (Becton Dickinson) que contienen heparina, y se diluyeron en igual volumen de SSTF. La sangre diluida se añadió a 1/3 del volumen de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB, NJ), y se centrifugó por 20 min a 2 000 rpm, a 25°C. Las células contenidas en la interfase se lavaron con SSTF y se centrifugaron durante 5 min a 1 200 rpm. Finalmente, se resuspendieron en SSTF-suero AB (SAB) a una densidad de 10^6 células/mL.

Reconocimiento de las líneas celulares humanas

Las células Ramos, Raji, Daudi y Jurkat (2×10^5 células) se incubaron con los AcMs acoplados a biotina (10 $\mu\text{g/mL}$) a 4°C, durante 30 min. A continuación, se lavaron con SSTF y se centrifugaron por 2 min, a 2 000 rpm. Posteriormente, se incubaron en iguales condiciones con una preparación de estreptavidina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, acrónimo del inglés *fluorescein isothiocyanate*; Dako, Glostrup, Dinamarca). Después del lavado las muestras se resuspendieron en 200 μL de SSTF.

Reconocimiento de linfocitos B humanos

Se incubaron 5×10^5 CMP a 4°C, por 30 min, con los anticuerpos acoplados a biotina, a 10 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se incubaron en iguales condiciones con estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE, sigla del inglés *phycoerythrin*) (BD Pharmingen, San Diego, CA) para detectar la unión de los anticuerpos, y un AcM a anti-CD19 humano conjugado a FITC (BD Biosciences Pharmingen, NJ), para la identificación de las células B.

Reconocimiento de la molécula CD20 por IHQ

Los cortes de tejidos frescos y embebidos en parafina se obtuvieron a partir de las amígdalas de donantes humanos (hospital CIMEQ) y se prepararon de acuerdo con los procedimientos de

referencia. Los cortes se incubaron a temperatura ambiente con el AcM recombinante anti-CD20, y se usó como control positivo el AcM comercial L26 (DAKO, Carpintería, USA). Para la visualización de la reacción antígeno-AcM se utilizó el complejo polímero–peroxidasa–anti ratón (Dako) y el revelado se efectuó con el cromógeno diaminobencidina (DAB+; Dako). La visualización y captura de las imágenes obtenidas se realizaron en un microscopio óptico con cámara acoplada (Olympus BX51, Japón).

RESULTADOS

Obtención del AcM recombinante anti-CD20 por transducción lentiviral

Por técnicas de ingeniería genética se obtuvieron las construcciones codificantes de las cadenas ligera y pesada del AcM recombinante de ratón específico por la molécula CD20 humana, las cuales se comprobaron por secuenciación automática. Estas se usaron, junto a los vectores auxiliares, en la transfección de las células HEK293T empaquetadoras. Con este procedimiento se obtuvieron preparaciones con títulos de 1.05×10^8 y 5.6×10^8 de partículas lentivirales funcionales por mililitro ((pvf)/mL) de Lv-VKCKRx y Lv-VHCHRx, respectivamente (datos no mostrados). Posteriormente, se realizó la transducción lentiviral y las células HEK293 genéticamente modificadas se clonaron por dilución limitante hasta obtener transductomas secretores del AcM recombinante anti-CD20, de ratón, con niveles de expresión de hasta 40 $\mu\text{g/mL}$ en cultivo estacionario, medidos por ELISA (Fig. 1).

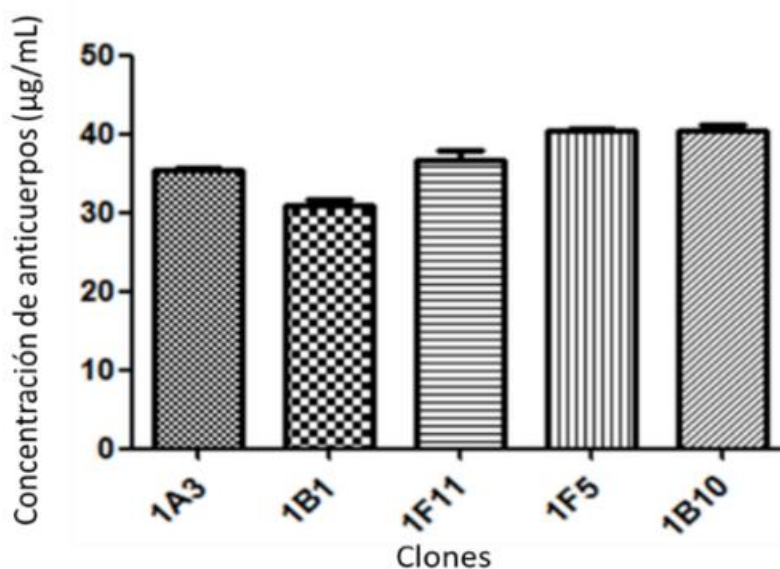


Fig. 1- Niveles de expresión del anticuerpo recombinante anti-CD20 por diferentes clones de células HEK293 transducidas.

Caracterización del AcM recombinante anti-CD20 producido en las células HEK293

Para la expresión y purificación del AcManti-CD20 se seleccionó el transductoma 1F5, con el mayor nivel de expresión en cultivo estacionario (Fig.1). El anticuerpo, a partir de ahora identificado de igual manera que el transductoma que lo produce (1F5), se purificó a partir del sobrenadante de cultivo, por cromatografía de afinidad con proteína A. El análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras del producto obtenido demuestra la integridad del anticuerpo (Fig. 2A), en tanto las condiciones reductoras del experimento evidenciaron la presencia de ambas cadenas de la molécula recombinante, con una migración correspondiente a las tallas esperadas (Fig. 2B). Los patrones de migración de las diferentes bandas en la electroforesis fueron semejantes a las del AcM4G9, también de isotipo IgG1 de ratón y por ende, de similar talla.

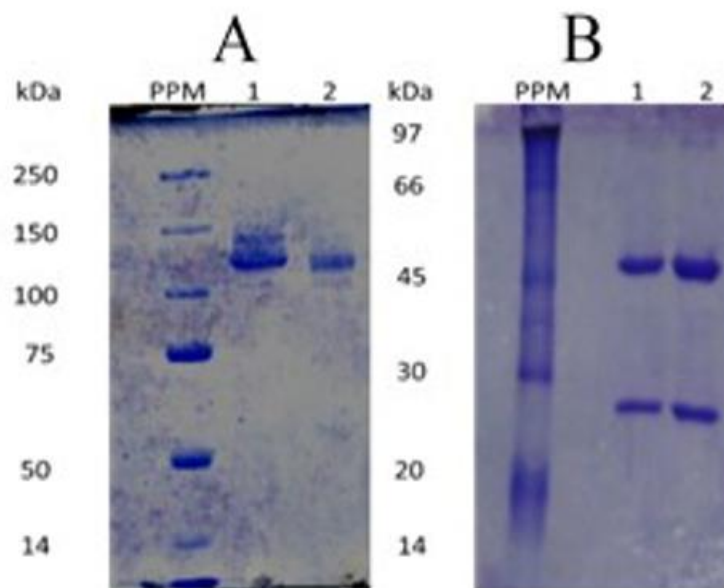


Fig. 2. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) del anticuerpo 1F5 purificado.

A) Condiciones no reductoras (7,5 % de poliacrilamida); B) Condiciones reductoras (12,5 % de poliacrilamida). Carril 1: 1F5 purificado, carril 2: AcM 4G9. PPM: patrón de peso molecular de amplio rango (A) y estrecho rango (B).

Reconocimiento de la molécula CD20

CMF

Para evaluar el reconocimiento de la molécula CD20 humana por el AcM 1F5, se hicieron ensayos de CMF usando diferentes líneas celulares humanas, y el AcM rituximab, como control positivo. Como se muestra en la figura 3, el anticuerpo obtenido reconoció las células Ramos, Raji y Daudi, que expresan dicha molécula. La intensidad del reconocimiento del 1F5, al igual que el rituximab, dependió de la línea celular en estudio, lo que pudo asociarse a los distintos niveles de expresión del CD20 humano. El mayor nivel de reconocimiento correspondió a la línea Ramos, y le siguieron la Daudi y Raji, en ese orden. Como se esperaba, no hubo diferencias apreciables en la intensidad de la señal al comparar ambos AcMs entre sí. Como control negativo del experimento se empleó la línea celular Jurkat, que no expresa la molécula CD20 humana.

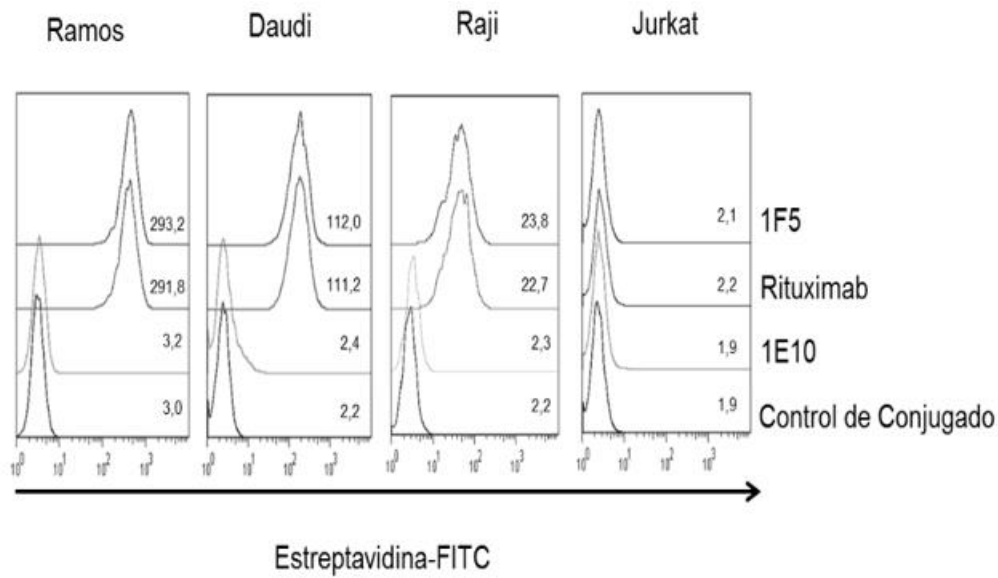


Fig. 3- Reconocimiento de líneas tumorales humanas por el anticuerpo 1F5. Se incluyen las intensidades medias de fluorescencia en cada caso. Los resultados son representativos de tres ensayos realizados.

Posteriormente, se extendió la evaluación del reconocimiento de esta molécula a los linfocitos de donantes humanos sanos y pacientes con trastornos linfoproliferativos de células B. El rituximab se usó como control positivo del experimento y los linfocitos B se identificaron por el marcaje con el AcM anti-CD19 conjugado a FITC.

El ensayo de CMF demostró que el 1F5 es capaz de reconocer a los linfocitos B de sangre periférica de un donante sano (Fig. 4A). Igualmente, se demostró la unión a los linfocitos obtenidos de igual fuente y procedentes de tres pacientes con LNH. En todos los casos, más del 90 % de las células B fueron reconocidas por el AcM1F5 (Fig. 4 B-D). Como se aprecia en la figura, los tres pacientes no presentaron igual porcentaje de células B en sangre periférica, lo que pudiera estar en concordancia con la alta heterogeneidad de los diferentes trastornos de células B agrupados en la categoría de LNH y las diferentes fases de la enfermedad. Se distinguen, además, diferencias entre los niveles de expresión de la molécula CD20 en los linfocitos B de los distintos pacientes.

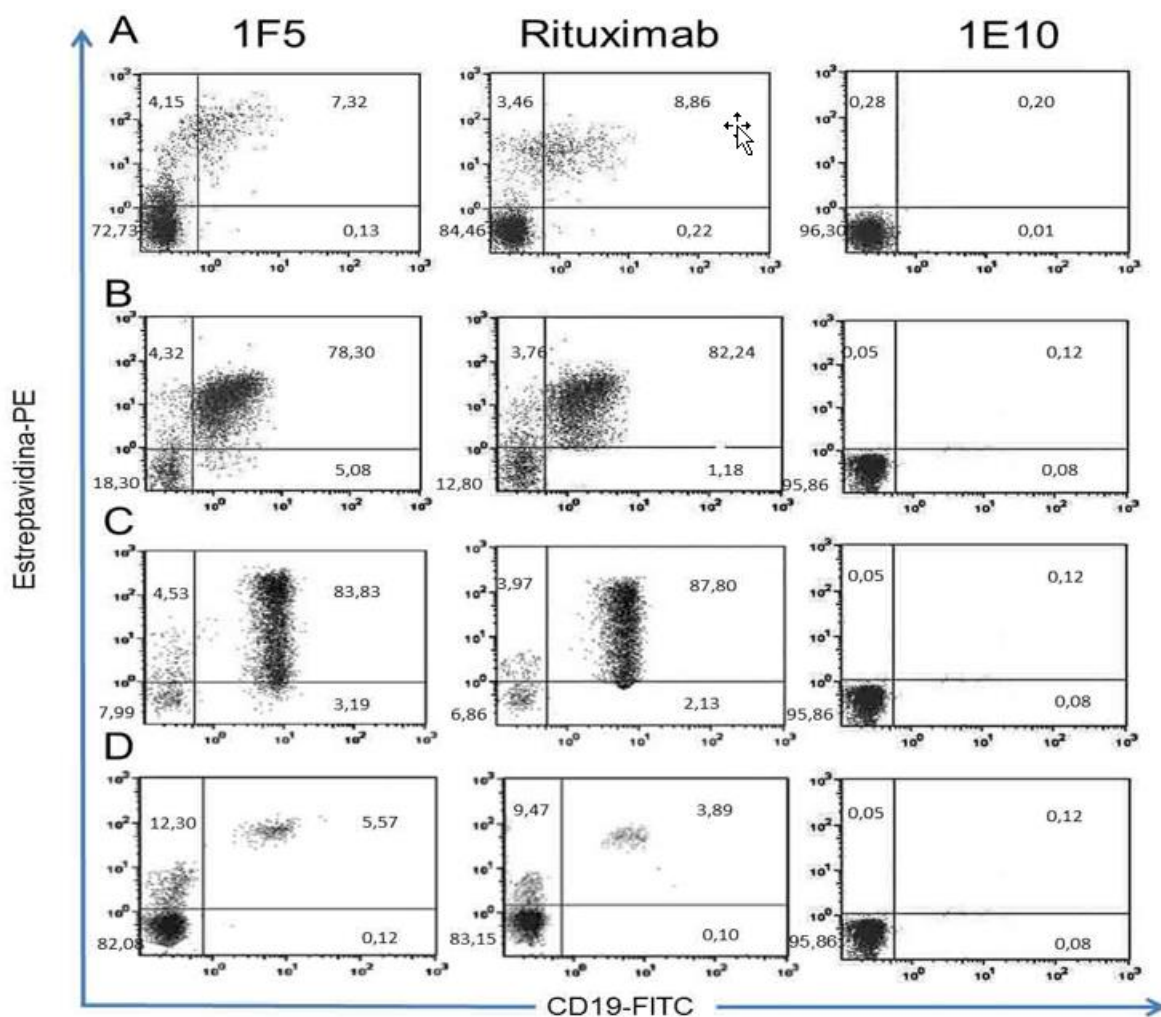


Fig. 4. Reconocimiento de linfocitos B humanos por el anticuerpo 1F5. (A) Células de un donante sano. (B-D)- tres pacientes con linfoma no Hodgkin.

IHQ

La IHQ es una técnica muy utilizada para caracterizar diversos trastornos linfoproliferativos. La unión del 1F5 a la molécula CD20 presente en los tejidos se evaluó por este método en cortes de muestras congeladas de amígdalas humanas, donde se observó un intenso marcaje folicular y escaso marcaje interfolicular, similar al obtenido por el control positivo (AcML26) (Fig. 5 A y B). Sin embargo, la evaluación de dichas muestras sobre el mismo tejido fijado con formalina y embebido en parafina, no mostró señal de reconocimiento con el AcM1F5 (Fig. 5 C y D), a diferencia del AcM L26.

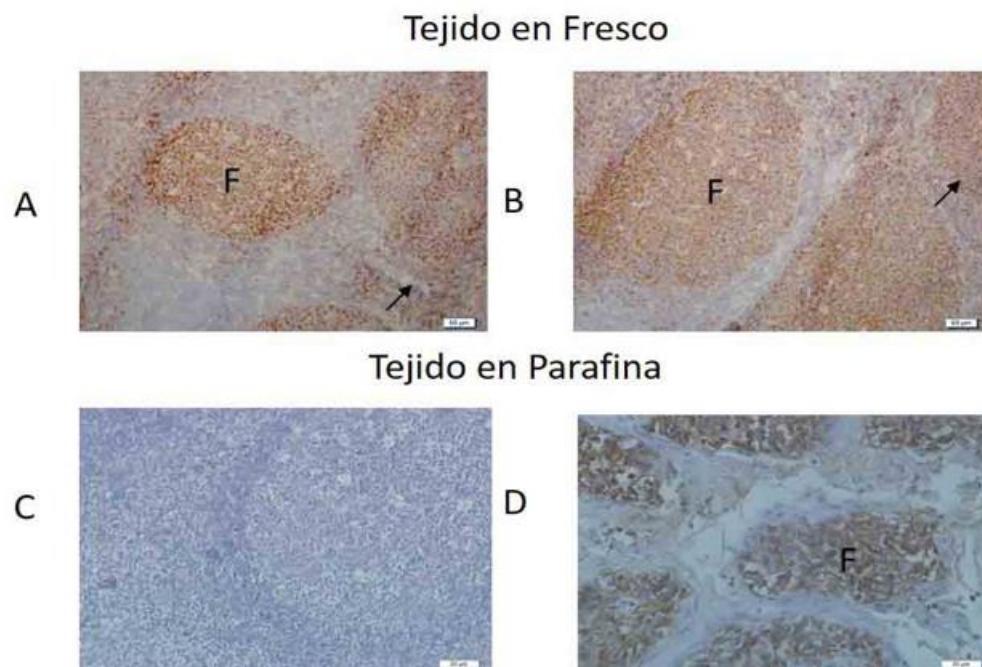


Fig. 5- Reconocimiento de la molécula CD20 en tejidos por el anticuerpo 1F5. Los cortes frescos de amígdala humana, o embebidos en parafina, se marcaron con: A) y C): anticuerpo 1F5; B) y D): anticuerpo L26.

F: Folículos. Las flechas indican el marcaje interfolicular. Observado con lentes a 40X.

DISCUSIÓN

En Cuba se introdujo hace varios años el uso del rituximab para el tratamiento de los pacientes con trastornos linfoproliferativos de células B como el LNH y la LLC. Incluso, para facilitar el acceso de los pacientes cubanos a este medicamento, el Centro de Inmunología Molecular (CIM) desarrolló un AcM biosimilar al rituximab, el 1B8,⁽⁷⁾ ya registrado en nuestro país. En consecuencia, el CIM decidió obtener una inmunoglobulina recombinante capaz de reconocer la molécula CD20 en los linfocitos B, como lo hace el rituximab y que pudiera ser utilizada para evaluar la expresión de este marcador celular. Para ello, se generó una versión recombinante IgG1 de ratón, de dicho AcM. Esto se logró mediante la ingeniería genética y el método de

transducción lentiviral, el cual se ha descrito como una metodología que permite la obtención de clones celulares con mayores productividades que los métodos comunes de transfección.

Mientras en los linfocitos B malignos de la LLC los niveles de CD20 son moderados, diferentes investigaciones han confirmado que en la mayoría de los linfomas B, el antígeno CD20 se expresa en una densidad mayor. Sin embargo, la presencia y la intensidad de la expresión varía según el tipo de linfoma y el estado de diferenciación de las células B.⁽⁸⁾ Incluso, se han encontrado variaciones en la expresión entre pacientes de una misma enfermedad. Este aspecto resulta de medular importancia para el diseño de terapias contra este blanco, como el caso del rituximab. En ese sentido, varios trabajos han evidenciado que la respuesta clínica al rituximab se relaciona con el grado de expresión de CD20, con peores resultados en aquellos pacientes con bajos niveles de esta molécula con respecto a los que exponen niveles superiores en la superficie celular.⁽⁹⁾

Aunque en el presente trabajo el AcM1F5 reconoció el CD20 en los cortes criogénicos de amígdalas de manera similar al L26, AcM muy utilizado en la práctica clínica para la detección de esta molécula, no fue capaz de identificarla en cortes histológicos de este tejido fijado con formalina y embebido en parafina. Esto es consistente con el marcaje negativo por el AcM rituximab, en iguales condiciones (datos no mostrados). Estos resultados pudieran deberse al enmascaramiento o pérdida irreversible del epítipo reconocido por ambos AcMs, debido al proceso de fijación. Este epítipo, en particular, se ubica en el dominio extracelular de la molécula CD20 y se ha descrito los residuos alanina 170 y prolina 172 de este son fundamentales para la unión del rituximab.⁽¹⁰⁾ Esto representa una desventaja en el uso del AcM 1F5 en IHQ respecto al AcML26, por cuanto este último detecta un epítipo resistente al procesamiento del tejido y permite su uso rutinario en tejidos fijados y embebidos en parafina.⁽¹¹⁾

La CMF es otra técnica a través de la cual se puede realizar inmunofenotipaje y que también se ha empleado en el estudio de los trastornos linfoproliferativos B. Mediante su uso, se demostró que el AcM1F5 es capaz de reconocer a la molécula CD20 no solo en líneas celulares que la expresan, sino también en linfocitos B de sangre periférica de donantes sanos y de pacientes con LNH. Incluso, se probó su capacidad, similar a la del rituximab, de discriminar entre los diferentes niveles de expresión, tanto en líneas celulares, como en las células de los pacientes estudiados. El grado diferencial de unión a las líneas celulares se corresponde con lo publicado

por Cardarelli et al, que demostraron que el rituximab reconoce con mayor intensidad a la línea celular Ramos y después a la Daudi y Raji, en ese orden. ⁽¹²⁾ En el caso de los linfocitos de los pacientes se observaron distintos perfiles de reconocimiento, debido a las diferencias en la magnitud y la homogeneidad de la expresión de CD20, dentro de la población de linfocitos B. Esto es consistente con reportes que describen una expresión heterogénea de la molécula CD20 en las diferentes manifestaciones de linfomas de células B. ⁽⁸⁾

Aunque las muestras evaluadas por CMF provenían de pacientes con LNH y donantes sanos, los resultados de esta técnica sugieren la potencial aplicación del 1F5 en la evaluación de la expresión de CD20 en pacientes con LLC, donde los linfocitos B malignos están más disponibles en el flujo sanguíneo. El rituximab se ha usado menos extensamente en la LLC respecto a los LNH, pero en la actualidad figura entre las variantes de primera línea de terapia para este tipo de trastorno linfoproliferativo B. ^(13,14)

En el caso de pacientes con LNH, tendría valor el uso del 1F5 por CMF en sangre periférica, solo si los pacientes se encuentran en fase de leucemización. No obstante, comprobadas las capacidades del 1F5 de reconocer la molécula CD20 por la mencionada técnica se pudiera, además, sugerir su uso para la identificación de esta molécula en suspensiones celulares obtenidas a partir de biopsias de ganglios linfoides. Diversas investigaciones han evidenciado que la CMF empleada en el análisis de suspensiones celulares frescas de este tejido, provenientes de pacientes con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), es más sensible en la detección de cambios en la expresión de CD20 que la IHQ del mismo tejido fijado. Lo anterior se debe probablemente a la menor resolución dinámica que tiene la IHQ. ⁽¹⁵⁾

En resumen, el AcM1F5 se convierte en una herramienta valiosa para la detección de la molécula CD20 humana. Específicamente, se valoró la utilidad del uso de la CMF con el anticuerpo 1F5 en la evaluación de pacientes con LLC o con LNH en fase de leucemización. Adicionalmente, se reconoce su uso potencial en la detección de la molécula CD20 en estadios más tempranos de cualquier linfoma B, a través de la CMF en suspensiones celulares de ganglios linfoides. Lo anterior no niega el empleo de este AcM en IHQ para analizar la expresión de CD20, pero supone un complemento a dicha técnica en la determinación de los posibles beneficiarios de la terapia con rituximab, o incluso, el biosimilar 1B8.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beers SA, Chan CH, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol.* 2010;47(2):107-14.
2. Cohen MD and Keystone E. Rituximab for Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol Ther.* 2015; 2:99–111.
3. Rydén-Aulin M, Boumpas D, Bultink I, Callejas Rubio JL, Caminal-Montero L, et al. Off-label use of rituximab for systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus Science & Medicine.* 2016;3:e000163.
4. Salzer J, Svenningsson R, Alping P, Novakova L, Björck A, Fink K et al. Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy. *Neurology.* 2016; 87:2074–81.
5. Rasheed A, Samad A, Raheem A, Hirani S, and Shabbir-Moosajee M., CD20 Expression and Effects on Outcome of Relapsed/Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma after Treatment with Rituximab. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(2):331-5.
6. Plasencia CA. Obtención de un clon de células CHO-K1 productor de un anticuerpo biespecífico y evaluación de su actividad biológica. (Tesis de Grado). Universidad de La Habana, La Habana. 2017.
7. Dorvignit D, Palacios JL, Merino M, Hernandez T, Sosa K, Casaco A, et al. Expression and biological characterization of an anti-CD20 biosimilar candidate antibody: a case study. *MAbs.* 2012;4(4):488-96.
8. Kloboves Prevodnik V, Horvat M, Lavrencak J, Jezersek Novakovic B. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep.* 2010; 24:1101–7.
9. Tokunaga T, Tomita A, Sugimoto K, et al. De novo diffuse large B-cell lymphoma with a CD20 immunohistochemistry-positive and flow cytometry-negative phenotype: Molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity. *Cancer Sci.* 2014;(105):35–43.

10. Klein Ch, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, Hopfner K-P, Umaña P and Niederfellner G. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs*. 2013;5(1):22–33.
11. Mason DY, Comans-Bitter MW, Cordell J, Verhoeven MA and van Dongent JJM. Antibody L26 Recognizes an Intracellular Epitope on the B-Cell-Associated CD20 Antigen. *American J Pathol*. 1990;136(6):1215-22.
12. Cardarelli PM, Quinn M, Buckman D, Fang Y, Colcher D, King DJ, et al. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')₂ is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother*. 2002;51(1):15-24.
13. Baer WH II, Maini A, Jacobs I. Barriers to the access and use of rituximab in patients with non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: A physician survey. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014;7:530–44.
14. Brown J, Cymbalista F, Sharman J, Jacobs I, Nava-Parada P, Mato A. The Role of Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment and the Potential Utility of Biosimilars. *Oncologist*. 2017;22:1–9.
15. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood*. 2009; 113(16):3773-80.

Conflicto de intereses

No se declara ningún conflicto.

Contribución de autoría

- Osmany Harteman: participó en el diseño del estudio, la adquisición, análisis e interpretación de datos, la escritura y revisión del manuscrito y en la aprobación de la versión final.
- Ana Victoria Casadesús: participó en la adquisición, análisis e interpretación de datos y la escritura y revisión del manuscrito y en la aprobación de la versión final.

- Cristina Mateo: participó en la concepción y diseño del estudio y en la escritura y revisión del manuscrito.
- Denise Dorvignit: participó en la adquisición, análisis e interpretación de datos y en la escritura y revisión del manuscrito.
- Teresita Rodríguez: participó en la concepción y diseño del estudio, el análisis e interpretación de datos, la escritura y revisión del manuscrito y en la aprobación de la versión final.
- Alejandro López-Requena: Participó en el diseño del estudio y la revisión y la aprobación de la versión final.
- Katya Sosa: participó en la adquisición de datos, la revisión y la aprobación de la versión final.
- Mercedes Cedeño: participó en la adquisición, análisis e interpretación de datos, la revisión y la aprobación de la versión final.
- Tays Hernández: participó en el diseño del estudio, el análisis e interpretación de datos, en la escritura, revisión y aprobación de la versión final.