

## **Seguiment per Citometria de Flux del tractament amb anticossos antiCD20 de malalties autoimmunes**

### **Introducció**

Les malalties autoimmunes engloben un conjunt de patologies a les que el sistema immunitari no reconeix degut a la pèrdua d'autotolerància, generant així una sèrie de respostes inflamatòries que acaben perjudicant al propi organisme. L'origen d'aquestes patologies són els limfòcits autorreactius que eludeixen la selecció negativa durant el procés maduratiu dels limfòcits, provocant la pèrdua d'autotolerància.

Clàssicament, les malalties autoimmunes estaven associades a la desregulació mediada per Limfòcits T o a la producció d'autoanticossos patògens per limfòcits B clonals. Tanmateix, els avenços en el camp de la immunologia han assenyalat que el paper dels limfòcits B a les malalties autoimmunes va més enllà de la producció d'autoanticossos i desenvolupen un rol complex en el fenomen de l'autoimmunitat, entre els quals, s'inclou la presentació d'autoantígens als limfòcits T i les seves interaccions recíproques, la secreció de citokines proinflamatòries i la generació de centres germinals ectòpics.

La creixent comprensió del rol que desenvolupen els limfòcits B a les malalties autoimmunes ens ha adreçat a l'ús terapèutic de tractaments per a la depleció de limfòcits B, no només en malalties clarament dominades pels mateixos, sinó també en malalties autoimmunes clàssicament associades als limfòcits T (com per exemple la Diabetis tipus I).

### **Limfòcits B**

En termes generals, els limfòcits B són limfòcits que tenen un paper important en la resposta immunitària humoral. Les funcions principals dels limfòcits B són fabricar anticossos contra antígens, funcionar com a cèl·lules presentadores d'antigen i eventualment transformar-se en cèl·lules de memòria B després de ser activades per la interacció amb l'antigen. Representen un component essencial del sistema immunitari adaptatiu.

Els limfòcits B provenen d'una cèl·lula hematopoètica del moll de l'os que origina una etapa de maduració antígen independent en la que es produeix el

# Catlab Informa

reordenament de cadenes pesades i lleugeres, seguit d'una fase de selecció negativa dels limfòcits B que destrueix o inactiva els limfòcits B autorreactius.

La següent fase, l'antigen dependent, es produeix al teixit limfoide. Les cèl·lules B madures naïve entren en contacte amb l'antigen a les regions extrafol·liculars on s'activen i pateixen una expansió clonal. Aquestes clones es diferenciarien en diferents subtipus de cèl·lules B: cèl·lules B de memòria, plasmablasts i cèl·lules plasmàtiques.

Aquestes diferents subpoblacions poden ésser identificades amb el marcador universal de cèl·lules B, el CD19, juntament amb altres marcadors específics com ho són el CD20, CD27, CD38 i CD138 (Figura 1).

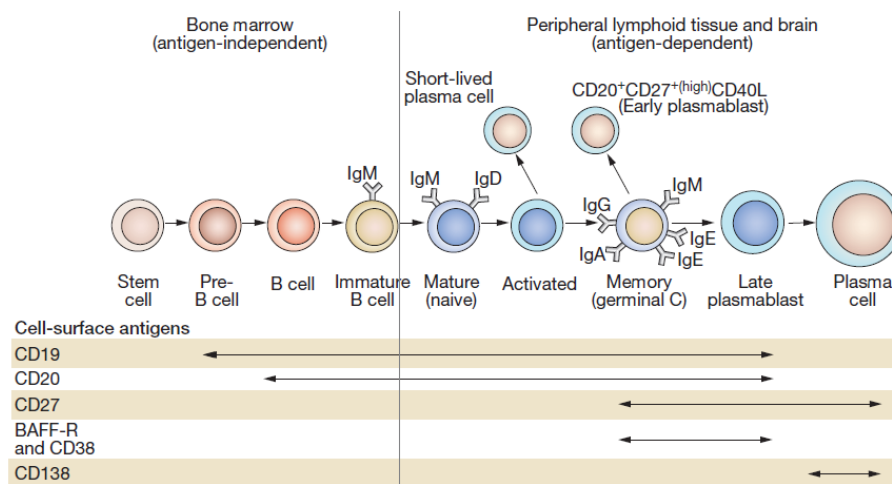


Figura 1. Maduració dels limfòcits B i els seus marcadors més característics (Dalakas MC et al, 2008)

Aquests últims estadiatges maduratius de la cèl·lula B comprenen diferents funcions dins del sistema immunològic:

Els limfòcits B de memòria circulen per l'organisme i comencen una resposta immunològica ràpida en el cas d'un nou contacte amb l'antigen. Tot i que aquests limfòcits no són directament els responsables de la producció d'anticossos, la seva activació antigen dependent estimula la seva proliferació ràpida i la seva diferenciació a cèl·lules plasmàtiques.

Les cèl·lules plasmàtiques constitueixen l'últim estadi de diferenciació dels limfòcits B i són els responsables de la síntesi d'autoanticossos patològics. Es

# Catlab Informa

tracta de cèl·lules secretores no proliferatives que s'encarreguen de sintetitzar una gran quantitat d'anticossos. Existeixen dos tipus de cèl·lula plasmàtica:

- Les cèl·lules plasmàtiques de vida curta. Es generen ràpidament durant el primer contacte amb l'antigen i acaben entrant en apoptosi després d'uns dies d'intensa síntesi d'anticossos.
- Les cèl·lules plasmàtiques de vida llarga. Es formen en una etapa més tardana de la infecció, madurant en els centres germinals i generant anticossos de major afinitat contra l'antigen. Les de vida llarga són capaces de sobreviure períodes llargs de temps, mantenint així la immunitat humoral durant anys.

## Teràpia anti-CD20

Actualment, les estratègies terapèutiques pel control de les malalties autoimmunes tenen com a diana els diferents punts d'acció i estadis evolutius dels limfòcits B. Dins d'aquestes estratègies podem trobar: la depleció dels limfòcits B, que partint de la premissa de que si s'eliminen aquestes cèl·lules B productores d'anticossos, es pot arribar a controlar la seva producció; el bloqueig de la senyalització cel·lular sobre diferents receptors de citoquines; i a fases més experimentals, la depleció de cèl·lules plasmàtiques.

D'aquestes estratègies, la teràpia més utilitzada per aconseguir la depleció de limfòcits B és l'ús d'anticossos monoclonals dirigits contra la fosfoproteïna CD20, un antigen específic de limfòcits B. Canal de Calci transmembrana implicat en l'activació, proliferació i diferenciació del limfòcit B.

Els tractaments amb anticossos monoclonals anti-CD20 actuen mitjançant diferents mecanismes, la inducció d'apoptosi cel·lular, la citotoxicitat mediada per anticossos i la citotoxicitat mediada pel complement. Aquests fàrmacs (en concret el Rituximab, Ofatumumab i Ocrelizumab) provoquen una depleció important dels limfòcits B a nivell perifèric, incloent als limfòcits B de memòria, tot i que no sempre aconseguen la seva depleció en teixits com el moll de l'os o els ganglis limfàtics.

# Catlab Informa

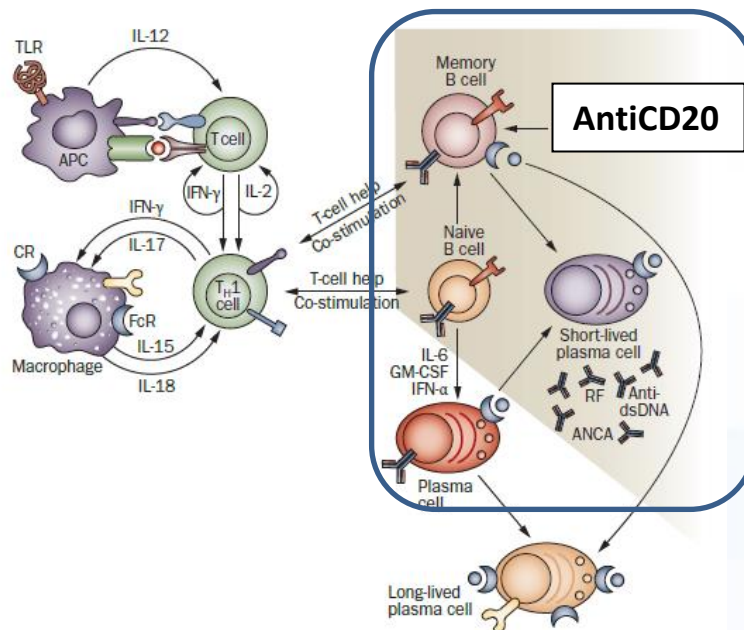


Figura 2. **Dianes de la teràpia amb anti-CD20.** La interacció entre les cèl·lules presentadores d'antigen i els limfòcits T és important durant l'activació del sistema immunitari adaptatiu. Els anticossos anti-CD20 produeixen una depleció de les cèl·lules B de memòria bloquejant la generació de cèl·lules plasmàtiques de vida curta implicades en la generació de auto-anticossos. (Dörner T. *et al*, 2009)

Les cèl·lules B en estadi pre-B o les cèl·lules plasmàtiques de vida llarga no es veuen afectades per aquests anticossos perquè no expressen la fosfoproteïna CD20. Això permet que els nivells d'anticossos produïts per les cèl·lules plasmàtiques un cop s'ha iniciat la teràpia amb anti-CD20 no pateixin una reducció dramàtica però en canvi, si que la millora clínica experimentada pels pacients remarca que els beneficis clínics d'aquesta teràpia provenen principalment d'altres funcions cel·lulars dels limfòcits B, com ja hem comentat prèviament. De tota manera, s'ha de tenir en compte que les cèl·lules plasmàtiques de vida curta continuen expressant CD20 a la seva superfície cel·lular i això les fa vulnerables a ser afectades per aquest tractament.

## Citometria

L'eficàcia dels tractaments dirigits anti-CD20 requereixen assolir una profunda depleció dels limfòcits B de memòria i plasmoblasts. La repoblació en sang perifèrica d'aquestes poblacions ha estat correlacionada amb el col·lapse de la malaltia o la resistència al tractament, mentre que la depleció sostinguda de limfòcits B de memòria i la reparació de limfòcits B naïve, són considerats signes positius de resposta clínica. Existeix, així, la necessitat de disposar d'un mètode analític que permeti monitoritzar la resposta al tractament mitjançant el

# Catlab Informa

seguiment de les subpoblacions limfocitàries B a la malaltia autoimmune. Aquesta metodologia és la citometria de flux.

La citometria de flux ens permet marcar, a través d'anticossos monoclonals lligats a molècules fluorescents, les proteïnes lligades a la superfície cel·lular i aquest fet ens possibilita la identificació i la quantificació de les subpoblacions limfocitàries B potencialment causants de la malaltia mitjançant l'alliberació d'autoanticossos patogènics, principalment limfòcits B de memòria i plasmablasts o cèl·lules plasmàtiques de vida curta. La identificació d'aquestes poblacions no resulta una novetat dins del camp de la citometria de flux, doncs ha estat utilitzada prèviament en el diagnòstic de les síndromes limfoproliferatives i la monitorització de les subpoblacions limfocitàries entre d'altres.

Tanmateix, la denominada Citometria de Flux convencional ha estat demostrada ineficaç per a la monitorització d'aquests tractaments perquè no s'arriba a la sensibilitat necessària per a la detecció fiable i reproduïble de les diferents subpoblacions B madures que poden persistir a baixes concentracions en pacients amb tractament anti-CD20. Els percentatges baixos i els recomptes absoluts d'aquestes subpoblacions B a sang perifèrica requereixen fer una bona monitorització, d'altres sensibilitats. Sensibilitats similars a les emprades als estudis de malaltia mínima residual pel mieloma múltiple.

Com en aquest mètode, la sensibilitat depèn directament del nombre de cèl·lules analitzades, cal introduir una nova tècnica preanalítica que ens permeti recuperar una gran quantitat de leucòcits de sang perifèrica sense interferències per abundant debris cel·lular o per una elevada presència d'eritròcits. La BulkLysi és una solució de lisat d'eritròcits lliure de fixadors que, mitjançant una lisi osmòtica, ens facilita l'eliminació dels eritròcits en quantitats significatives de la mostra, sense afectar això a la sèrie leucocitària. Aquesta tècnica suposa un augment de la complexitat preanalítica de la prova, però permet aconseguir uns nivells elevats de sensibilitat per a dur a terme una monitorització més precisa d'aquests tractaments, seguint la recomanació de la Italian Society for Clinical Cell Analysis (ISCCA) d'adquirir en el citòmetre almenys un milió d'events CD45+.

Els anticossos de marcatge d'aquest panell han de proveir la informació necessària per a la detecció de les subpoblacions de cèl·lules B en els últims estadis maduratius presents a la sang perifèrica. Així, amb el marcador pan-B CD19 i d'altres marcadors d'interès, es detectaran les poblacions descrites a la següent taula:

# Catlab Informa

Fenotip	Població B
<b>CD45+/- CD19+ CD20- CD38+ CD27-</b>	Precursors B
<b>CD45+/- CD19+ CD20- CD38+ CD27+</b>	Cèl·lules plasmàtiques / Plasmablasts
<b>CD45+ CD19+ CD20+ CD38- CD27-</b>	Limfòcits B naive
<b>CD45+ CD19+ CD20+ CD38- CD27+</b>	Limfòcits B de memòria
<b>CD45+ CD19+ CD20+ CD38- CD27+ sIgM+</b>	Limfòcits B de memòria sIgM+ Non-class switched
<b>CD45+ CD19+ CD20+ CD38- CD27+ sIgG+</b>	Limfòcits B de memòria sIgG+ Class switched
<b>CD45+ CD19+ CD20+ CD38- CD27+ sIgG- sIgM-</b>	Limfòcits B de memòria sIgA+ sIgD+

Tabla 1. Fenotip de les diferents subpoblacions B d'interès en la monitorització de teràpies anti-CD20.

La detecció de precursors B i de cèl·lules plasmàtiques i/o plasmablasts facilita poder realitzar una selecció neta sobre la població de limfòcits B madurs (CD45+ CD19+ CD20+), que a l'hora permet la selecció de limfòcits B de memòria CD27+. La subclassificació dels limfòcits B de memòria CD27+ segons les seves diferents expressions de immunoglobulina a la seva superfície, pot donar-nos informació sobre el procés maduratiu d'aquests limfòcits. Malgrat tot, i la potencial rellevància clínica d'aquestes dades, a dia d'avui no existeixen prou evidències com per poder establir un factor pronòstic segons la distribució sIgG/sIgM.

# Catlab Informa

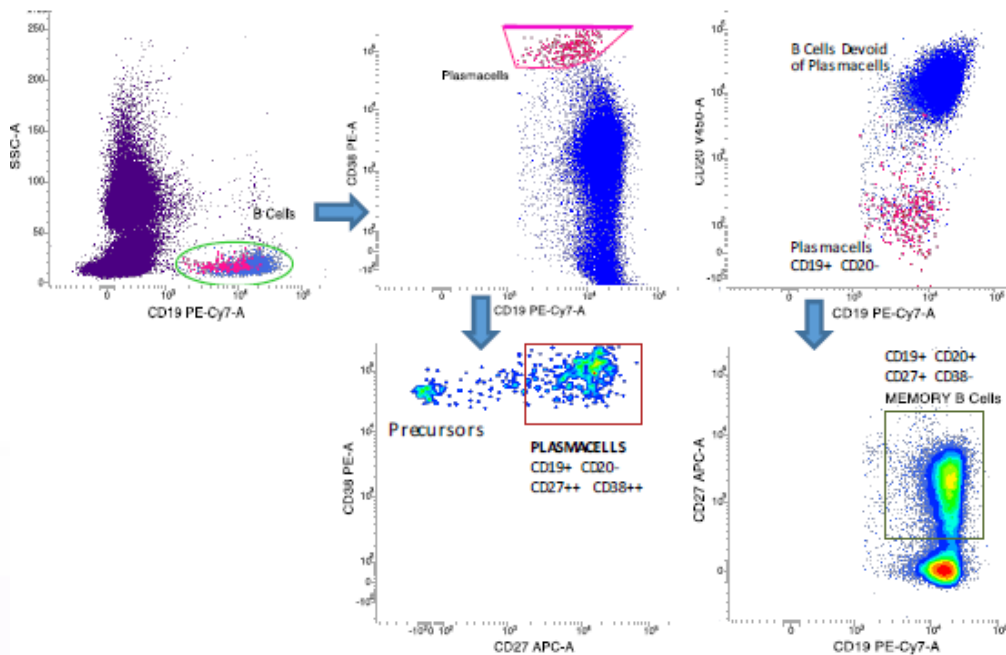


Figura 3. Pautes d'anàlisi d'un panell per a la monitorització de teràpies anti-CD20 (Gatti A et al, 2021).

La monitorització de les teràpies anti-CD20 amb el nostre estudi permet confirmar una depleció quasi total dels limfòcits B a sang perifèrica des de l'inici del tractament, demostrant així l'eficàcia del fàrmac; o contràriament una depleció incompleta, o bé la reaparició precoç de poblacions de limfòcits B durant el tractament que ens indicarà una possible resistència o refractarietat a la teràpia aplicada. Actualment, el grau de depleció dels limfòcits B és el factor millor correlacionat amb la resposta clínica al tractament anti-CD20. En aquest sentit, alguns autors han proposat com a "depleció" valors inferiors a 5 cèl·lules B /  $\mu$ L (E. Becerra et al, 2017), però l'European Society for Cell Analysis (ESCCA) considera excessivament elevats aquests valors i incideixen en la necessitat d'utilitzar majors sensibilitats en aquesta tècnica.

En el mateix tarannà, aquest estudi possibilita monitoritzar el temps fins a la fase de repoblació dels limfòcits B i el grau de resposta al tractament. És orientatiu d'una resposta favorable l'aparició de limfòcits B naïve (CD27-) o de limfòcits B de memòria Non-class switched (CD27+, sIgM+); i indicatiu de resistència al

# Catlab Informa

tractament i/o probabilitat de recaiguda, la detecció de cèl·lules plasmàtiques/plasmablasts, o de limfòcits B de memòria Class swiched (CD27+, sIgG+).

Malgrat la informació que aquest panell ens pot proporcionar, hem de recalcar que la literatura científica fins al moment resulta molt heterogènia pel que fa a les sensibilitats assolides i a les diferents patologies examinades. Per tant, a dia d'avui no existeixen unes guies d'actuació que puguin facilitar al clínic d'un programa de monitorització amb intervals de temps ben definits segons els diferents nivells de cèl·lules B. Si que existeixen algunes propostes per a intervals de monitorització a l'artritis reumatoide per citometria de flux d'alta sensibilitat (Gatti A et al, 2020).

A Catlab considerem que la incorporació d'aquest panell d'estudi al nostre catàleg de proves és una oportunitat d'oferir una informació clínica rellevant en la monitorització de les teràpies anti-CD20, així com un eina pels facultatius clínics, principalment per a internistes i neuròlegs, per a desenvolupar i incorporar nous protocols de monitorització en funció de la patologia autoimmune que permeti una medicina més personalitzada i que vetlli per la seguretat del pacient.

**Yolanda Donate**

Resident d'Anàlisis Clíniques  
CATLAB  
[ydonate@catlab.cat](mailto:ydonate@catlab.cat)  
[www.catlab.cat](http://www.catlab.cat)

**Dr. Carlos Lázaro**

Facultatiu Àrea Citometria de Flux  
CATLAB  
Tel. 93.748.56.00 – ext. 35041 /  
626.18.46.51  
[clazaro@catlab.cat](mailto:clazaro@catlab.cat)  
[www.catlab.cat](http://www.catlab.cat)

**Dra. Judith Vidal**

Facultativa Responsable Àrea  
Citometria de Flux  
CATLAB  
Tel. 93.748.56.00 – ext. 35041 /  
616.26.48.91  
[jvidal@catlab.cat](mailto:jvidal@catlab.cat)  
[www.catlab.cat](http://www.catlab.cat)



# Catlab Informa

## Referències

Gatti A, Buccisano F, Scupoli MT, Brando B. The ISCCA flow protocol for the monitoring of anti-CD20 therapies in autoimmune disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(2):194-205. doi:10.1002/cyto.b.21930

Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine.* 2017;16:41-50. doi:10.1016/j.ebiom.2017.01.042

Du FH, Mills EA, Mao-Draayer Y. Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. *Auto Immun Highlights.* 2017;8(1):12. Published 2017 Nov 16. doi:10.1007/s13317-017-0100-y

Crickx E, Weill JC, Reynaud CA, Mahévas M. Anti-CD20-mediated B-cell depletion in autoimmune diseases: successes, failures and future perspectives. *Kidney Int.* 2020;97(5):885-893. doi:10.1016/j.kint.2019.12.025

Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):2993-2999. doi:10.1002/art.23902

Becerra E, De La Torre I, Leandro MJ, Cambridge G. B cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis relapsing after rituximab: expression of B cell-activating factor-binding receptors on B cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 2017;190(3):372-383. doi:10.1111/cei.13024

Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(10):557-567. doi:10.1038/ncpneuro090