



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 068**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03756746 .8**

96 Fecha de presentación : **13.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549764**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Cebadores de amplificación de ácidos nucleicos para estudios de clonalidad basada en PCR.**

30 Prioridad: **11.10.2002 US 417779 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2011

73 Titular/es: **Erasmus Universiteit Rotterdam**
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Garzia Sanz, Ramón;**
Parreira, Antonio;
Smith, John, Lewis;
Evans, Paul, Anthony, Stuart;
Macintyre, Elizabeth, Anne;
Bastard, Christian;
Davi, Frederic, Bernard, Louis;
San Miquel, Jesús, Fernando;
Morgan, Gareth, John;
Kneba, Michael;
Hummel, Michael;
Langerak, Anthonie, Willem;
Lavender, Frances, Louise;
Van Dongen, Jacobus, Johannes, Maria;
Schuuring, Eduardus, Maria, Dominicus y
Bruggemann, Monika

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a estudios de clonalidad basados en PCR para, entre otros, el diagnóstico temprano de los trastornos linfoproliferativos. En la mayoría de los pacientes con presuntos trastornos linfoproliferativos, la histomorfología o citomorfología complementadas con inmunohistología o inmunofenotipado mediante citometría de flujo pueden distinguir entre las linfoproliferaciones malignas y reactivas. Sin embargo, en un 5 a un 10% de los casos, es más complicado realizar el diagnóstico. El diagnóstico de las neoplasias malignas linfoides se puede respaldar mediante el estudio de la clonalidad basado en el hecho de que en principio todas las células de una neoplasia maligna tienen un origen clonal común.

La mayoría de las neoplasias malignas linfoides pertenece al linaje de células B (90 al 95%), y solamente una minoría pertenece al linaje de células T (5-7%) o al linaje de células NK (<2%). Las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) tienen un origen de células T en el 15 al 20% de los casos, pero en el grupo de las leucemias linfoides maduras y en los linfomas no Hodgkin (LNH) las neoplasias malignas de células T son relativamente infrecuentes, excepto para subgrupos específicos tales como los linfomas cutáneos (Tabla 1). Por lo tanto, la gran mayoría de las neoplasias malignas linfoides (>98%) contiene genes de inmunoglobulinas (Ig) y/o receptores de células T (TCR) reordenados de manera idéntica (clonalmente), y en el 25 al 30% de los casos también se hallan anomalías cromosómicas bien definidas, todo lo cual puede servir como marcador de la clonalidad.^{1,2}

Los loci de los genes de Ig y TCR contienen muchos segmentos génicos variables (V), diversos (D), y de unión (J) diferentes, que están sometidos a procesos de reordenamiento durante la diferenciación linfóide temprana.^{3,4} Los reordenamientos V-D-J están mediados por un complejo enzimático recombinasa en el que las proteínas RAG1 y RAG2 desempeñan un papel fundamental reconociendo y cortando el ADN en las secuencias señal de recombinación (RSS), que están localizadas en dirección 3' respecto de los segmentos génicos V, a ambos lados de los segmentos génicos D, y en dirección 5' de los segmentos génicos J (Figura 1). Las RSS inadecuadas reducen o incluso impiden completamente el reordenamiento.

El proceso de reordenamiento comienza en general con un reordenamiento D a J seguido por un reordenamiento V a D-J en el caso de los genes de la cadena pesada de Ig (*IGH*), TCR beta (*TCRB*), y TCR delta (*TCRD*) (Figura 1), o implica reordenamientos directos V a J en el caso de los genes de Ig kappa (*IGK*), Ig lambda (*IGL*), TCR alfa (*TCRA*), y TCR gamma (*TCRG*). Las secuencias entre los segmentos génicos reordenados generalmente se delecionan en forma de un producto de escisión circular, también denominado círculo de escisión de TCR (TREC) o círculo de escisión de receptores de células B (BREC) (Figura 1).

Los reordenamientos de los genes de Ig y TCR durante la diferenciación linfóide temprana siguen generalmente un orden jerárquico. Durante la diferenciación de las células B: primero se reordenan los genes *IGH*, después *IGK*, lo que potencialmente da como resultado la expresión de IgH/k o seguido por la delección de *IGK* y el reordenamiento de *IGL*, potencialmente seguido por la expresión de IgH/λ.⁵ Esto implica que prácticamente todas las células B Igλ⁺ tienen delecciones del gen *IGK* monoalélicas o bialélicas. Durante la diferenciación de las células T: primero se reordenan los genes *TCRD*, después *TCRG*, lo que potencialmente da como resultado la expresión de TCRγδ o seguido por el reordenamiento posterior de *TCRB* y la delección de *TCRD* con el reordenamiento posterior de *TCRA*, potencialmente seguido por la expresión de TCRαβ. Los patrones de reordenamiento de los genes de Ig y TCR en las neoplasias malignas linfoides se ajustan en general al orden jerárquico anteriormente descrito, aunque también se hallan patrones de reordenamiento poco habituales en particular en LLA.⁶

Las muchas combinaciones diferentes de segmentos génicos V, D, y J representan el denominado repertorio combinatorio (Tabla 2), que se estima que es ~2×10⁶ para las moléculas Ig, ~3×10⁶ para las moléculas TCRαβ y ~5×10³ para las moléculas TCRγδ. En los sitios de unión de los segmentos génicos V, D, y J, se da la delección y la inserción aleatoria de nucleótidos durante el proceso de reordenamiento, lo que da como resultado regiones de unión muy diversas, lo que contribuye de manera significativa al repertorio total de moléculas Ig y TCR, que se estima que es >10^{12,5}.

Los linfocitos B maduros amplían adicionalmente su repertorio de Ig tras el reconocimiento del antígeno en los centros foliculares por medio de la *hipermutación somática*, un proceso que conduce a la maduración por afinidad de las moléculas Ig. El proceso de hipermutación somática se centra en el exón V-(D)-J de los genes *IGH* y de la cadena ligera de Ig, e implica mutaciones de nucleótidos individuales y a veces también inserciones o delecciones de nucleótidos. Los genes de Ig mutados somáticamente se hallan también en las neoplasias malignas células B maduras de origen folicular o post-folicular.⁷

Los genes de Ig y TCR reordenados funcionalmente dan como resultado la expresión en las membranas superficiales de moléculas de Ig, TCRαβ, o TCRγδ. Basándose en el concepto de que solamente un único tipo de molécula Ig o TCR se expresa en un linfocito o en un clon de linfocitos, los genes reordenados clonalmente de las neoplasias malignas linfoides maduras podrían ser detectables a

nivel proteico. La detección de la expresión de cadenas ligeras de Ig únicas (Igκ o Igλ) se ha usado durante mucho tiempo para distinguir entre los linfocitos B reactivos (policlonales) (proporción Igκ/Igλ normal: 0,7 - 2,8) frente a los linfocitos B anormales (clonales) con proporciones Igκ/Igλ de >4,0 o <0,5.⁸⁻¹⁰ En la gran mayoría (>90%) de las neoplasias malignas de células B maduras, la expresión de cadenas ligeras de Ig únicas puede respaldar el origen clonal de la neoplasia maligna.

Además, el desarrollo de muchos anticuerpos diferentes contra dominios variables de las diversas cadenas de TCR permite la detección de dominios Vβ, Vγ y Vδ monotípicos, cuando se comparan con los valores de referencia adecuados.¹¹⁻¹⁶ En la interpretación de los resultados de Vβ monotípicos mediante el uso de 20 a 25 anticuerpos contra diferentes familias de Vβ (Tabla 2), se debería tener en cuenta que las expansiones de células T TCRαβ⁺ clonales clínicamente benignas (con frecuencia CD8⁺) se hallan frecuentemente en sangre periférica (PB) de individuos mayores.¹³ Estas expansiones de células T clonales en PB son, sin embargo, relativamente pequeñas en tamaño: <40% de los linfocitos T de PB y <0,5x10⁶/ml de PB.¹³ Todavía no está claro hasta qué punto tales clones de células T clínicamente benignas se pueden hallar también en los tejidos linfoides.

Los resultados de la expresión de los dominios Vγ y Vδ monotípicos se deberían interpretar con cautela, debido a que en los individuos sanos una gran fracción de los linfocitos T TCRγδ⁺ policlonales normales se ha seleccionado para el uso de Vγ9-Jγ1.2 y Vδ2-Jδ1.^{18, 19} Por lo tanto, las frecuencias elevadas de linfocitos T Vγ9⁺/Vδ2⁺ en PB se debería considerar como un hallazgo normal, a menos que el recuento absoluto sea de 1 a 2x10⁶/ml de PB. Se debería indicar que la mayoría de las neoplasias malignas de células T TCRγδ⁺ expresan Vδ1 u otro segmento génico que no es Vδ2 en combinación con un único dominio Vγ (en general no Vγ9).^{15, 20}

La detección de la expresión restringida de Igκ o Igλ o la expresión de Vβ, Vγ o Vδ monotípicos es relativamente fácil en los estudios de citometría de flujo de muestras de PB y de médula ósea (BM) de pacientes con leucemias de células T o células B maduras. Sin embargo, esto parece ser más difícil en muestras de tejidos con presuntos trastornos linfoproliferativos que están mezclados con linfocitos normales (reactivos).

En contraste con las técnicas basadas en anticuerpos, las técnicas moleculares son generalmente aplicables para la detección de los genes de Ig/TCR reordenados clonalmente, así como anomalías cromosómicas bien definidas. Previamente esto implicaba el análisis mediante transferencia de Southern, pero en la actualidad se usan en particular las técnicas de PCR.

Se presentan dificultades para realizar un diagnóstico final de una neoplasia maligna linfóide en una proporción de casos (5 al 10%) a pesar del inmunofenotipado exhaustivo. Por lo tanto, se necesita un diagnóstico adicional (clonalidad molecular) para generar o confirmar el diagnóstico final, tal como en el caso de:

- cualquier presunta proliferación de células B en la que la morfología y el inmunofenotipado no son concluyentes;
- cualquier presunta proliferación de células T (PRECAUCIÓN: LNH-B rico en células T);
- linfoproliferaciones en pacientes inmunodeficientes o pacientes trasplantados;
- evaluación de la relación clonal entre dos neoplasias malignas linfoides en un paciente o distinción entre una recidiva y una segunda neoplasia maligna;
- clasificación adicional de una neoplasia maligna, p.ej. por medio de patrones de reordenamiento de los genes de Ig/TCR o anomalías cromosómicas particulares;
- ocasionalmente: estadificación de linfomas.

Durante mucho tiempo, el análisis de transferencia de Southern ha sido la técnica de referencia para los estudios moleculares de clonalidad. La transferencia de Southern se basa en la detección de fragmentos de ADN que no son de la línea germinal ("reordenados"), obtenidos tras la digestión con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción bien elegidas (que dan como resultado fragmentos de 2 a 15 kb) y las sondas de ADN bien posicionadas (en particular las sondas en posición 3' del segmento J) permiten la detección de prácticamente todos los reordenamientos de los genes de Ig y TCR, así como las anomalías cromosómicas relacionadas con los segmentos génicos J.²¹⁻²⁸ Se debería indicar que el análisis de transferencia de Southern se centra en la diversidad de reordenamientos de los segmentos génicos de Ig/TCR, y por lo tanto aprovecha el repertorio combinatorio.

Los resultados de una transferencia de Southern óptima para el estudio de la clonalidad se pueden obtener en particular con los genes *IGH*, *IGK*, y *TCRB*, porque estos genes tienen un repertorio combinatorio extenso, así como una estructura génica relativamente simple que se puede estudiar con solamente una o dos sondas de ADN.^{22, 24, 28} Los genes *IGL* y *TCRA* son más complejos y requieren múltiples grupos de sondas.^{25, 26, 29} Finalmente, los genes *TCRG* y *TCRD* tienen un repertorio combina-

torio limitado, que es menos óptimo para la distinción entre monoclonalidad y policlonalidad por medio de un análisis de transferencia de Southern.^{20, 21}

5 A pesar de la elevada fiabilidad del análisis de transferencia de Southern, está siendo sustituido progresivamente por las técnicas de PCR, debido a varias desventajas inherentes: el análisis de transferencia de Southern consume tiempo, es técnicamente exigente, requiere de 10 a 20 µg de ADN de elevada calidad, y tiene una sensibilidad limitada del 5 al 10%.²¹

10 La detección de los genes de Ig/TCR reordenados y las anormalidades cromosómicas mediante las técnicas de PCR requiere un conocimiento preciso de los segmentos génicos reordenados para diseñar cebadores adecuados a los lados opuestos de las regiones de unión y de las regiones de fusión del punto de ruptura, respectivamente.

15 En los estudios de clonalidad basados en PCR rutinarios, la distancia entre los cebadores debería ser menor de 1 kb, preferiblemente menor de 500 pb. Esto es importante en particular para la distinción entre los productos de PCR de reordenamientos de los genes de Ig/TCR monoclonales frente a los policlonales, que se basa en la diversidad de las regiones de unión (diversidad de tamaño y composición). Hasta ahora, se han usado principalmente los reordenamientos de los genes *IGH* y *TCRG* para los estudios de clonalidad basados en PCR, debido al número limitado de cebadores necesarios para detectar los reordenamientos V_H-J_H y $V\gamma-J\gamma$.

20 Las principales ventajas de las técnicas de PCR son su velocidad, las bajas cantidades de ADN necesarias, la posibilidad de usar ADN de baja calidad, y la sensibilidad relativamente buena del 1 al 5%, para algunos tipos de reordenamientos incluso <1%. Por lo tanto, las técnicas de PCR permiten el uso de pequeñas biopsias (p.ej. biopsias mediante aspiración con aguja fina), o el uso de muestras incrustadas en parafina fijadas con formaldehído, lo que generalmente da como resultado ADN de calidad más baja. Por lo tanto, también se podría usar el material archivado, si fuera necesario.

25 El documento WO 02/00848 describe un método basado en PCR para la detección de reordenamientos V_H-J_H , véanse en particular los cebadores VH_3 y $VLJH$.

Los estudios de clonalidad molecular pueden ser sumamente informativos, pero varias limitaciones y dificultades podrían obstaculizar la interpretación de los resultados obtenidos con los métodos de detección convencionales:

1. Sensibilidad limitada, relacionada con el fondo policlonal normal

30 El límite de detección varía entre el 1% y el 10% (o incluso el 15%), dependiendo de la técnica aplicada (análisis de transferencia de Southern o técnicas de PCR) y dependiendo del tamaño relativo del "fondo" de linfocitos B y T (policlonales) normales. Una sensibilidad limitada podría dificultar la detección de poblaciones celulares clonales pequeñas con menos del 5 al 10% de células linfoides clonales.

2. Clonalidad no es equivalente a neoplasia maligna

35 La detección de clonalidad no implica siempre la presencia de una neoplasia maligna. Algunas proliferaciones clínicamente benignas tienen un origen clonal, tales como muchos casos de linfocitosis T $CD8^+$ (o a veces $CD4^+$), gammapatías monoclonales benignas, fases iniciales de linfoproliferaciones EBV⁺ (que frecuentemente son oligoclonales) en pacientes inmunodeficientes, y proliferaciones de células T cutáneas benignas, tales como papulosis linfomatoide, etc. Esto implica que los resultados de los estudios de clonalidad molecular se deberían interpretar siempre en el contexto del diagnóstico clínico, morfológico e inmunofenotípico, es decir, en estrecha colaboración con hematólogos, citomorfólogos, patólogos e inmunólogos.

3. Los reordenamientos de los genes de Ig y TCR no son marcadores del linaje

45 En contraste con la suposición inicial, actualmente ha estado claro durante más de una década que los reordenamientos de los genes de Ig y TCR no se limitan necesariamente a los linajes de células B y células T, respectivamente. Los reordenamientos de los genes de TCR entre linajes se dan con relativa frecuencia en las neoplasias malignas de células B inmaduras, en particular en LLA-precursores B (>90% de los casos),³⁰ pero también las leucemias mieloides agudas (LMA) y las neoplasias malignas de células B maduras podrían contener reordenamientos de los genes de TCR.³¹⁻³³ Aunque con una frecuencia menor, también se da un reordenamiento de los genes de Ig entre linajes en las neoplasias malignas de células T y en LMA, que principalmente implica el locus de la cadena pesada de Ig (*IGH*).^{33, 34}

55 Prácticamente todas las neoplasias malignas de células T $TCR\alpha\beta^+$ (>98%) tienen reordenamientos del gen *TCRG* (en general bialélicos) y muchas neoplasias malignas de células T $TCR\gamma\delta^+$ tienen reordenamientos del gen *TCRB*, lo que implica que la detección de los reordenamientos de *TCRB* o *TCRG* tampoco es indicativa de las células T del linaje de células T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, respectivamente.

Además de estos reordenamientos entre linajes, se ha establecido que varias neoplasias malignas linfoides tienen patrones de reordenamientos de los genes de Ig/TCR poco habituales. Esta

información está disponible con detalle para LLA-precursores B y LLA-T, pero todavía no lo está para la mayoría de las demás neoplasias malignas linfoides.⁶

4. Pseudoclonalidad y oligoclonalidad

5 La detección de una población de células linfoides aparentemente clonal o aparentemente oligoclonal (pseudoclonalidad) es poco frecuente en el análisis de transferencia de Southern, a menos que se usen genes con un repertorio combinatorio limitado, tales como *TCRG* o *TCRD*. Esto podría dar como resultado bandas reordenadas débiles, p.ej. que representen reordenamientos V γ 9-J γ 1.2 o V δ 2-J δ 1 derivados de linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ seleccionados por antígenos. Con todo, esta es una dificultad muy conocida del análisis de transferencia Southern, y no dará como resultado bandas reordenadas de
10 densidad elevada.

La pseudoclonalidad en los estudios de clonalidad basados en PCR es más difícil de reconocer. La sensibilidad elevada de la PCR puede provocar la amplificación de los pocos reordenamientos de los genes de Ig o TCR derivados de un número limitado de células B o células T en la muestra de tejido estudiada. En particular, las pocas células T reactivas (policlonales) en una biopsia con aguja pequeña o
15 en una muestra de LNH-B con una carga tumoral elevada podrían dar como resultado productos de PCR (oligo)clonales. Con frecuencia, la cantidad de tales productos de PCR es limitada. Esto se observa en particular cuando se usan los genes *TCRG* como objetivo de la PCR. Los análisis de PCR por duplicado o triplicado seguidos por la mezcla de los productos de PCR obtenidos deberían ayudar a clarificar si los productos de PCR aparentemente clonales proceden de hecho de diferentes linfocitos.

20 Finalmente, los nódulos linfáticos reactivos pueden mostrar una diversidad reducida del repertorio de Ig/TCR, provocada por la predominancia de varios subclones seleccionados por antígenos (oligoclonalidad). En particular, las muestras de nódulos linfáticos o de sangre de pacientes con una infección activa por EBV o CMV pueden mostrar un repertorio de TCR limitado u oligoclonalidad de los genes de TCR. Además, los cuadros clínicos de inmunosupresión están asociados con frecuencia a
25 repertorios de TCR limitados, p.ej. en pacientes de trasplantes o en pacientes de tricoleucemia.³⁵ La recuperación del trasplante y la remisión hematológica van seguidas por el restablecimiento del repertorio de TCR policlonal.^{36, 37}

5. Resultados positivos falsos

30 En el análisis de transferencia de Southern, los resultados positivos falsos son poco frecuentes y se pueden evitar en general realizando comprobaciones en busca de una digestión incompleta y excluyendo los sitios de restricción polimórficos.²¹

Los resultados de PCR positivos falsos constituyen un problema grave, si no se lleva a cabo un análisis adecuado de los productos de PCR obtenidos para distinguir entre los productos de PCR monoclonales o policlonales. Tal distinción se puede llevar a cabo por medio de un análisis de
35 polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP),³⁸ electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE),³⁹ análisis heterodúplex (HD)^{40, 41} o análisis GeneScan (GS).^{42, 43} Estas técnicas aprovechan la diversidad de las regiones de unión para la distinción entre las células monoclonales con regiones de unión idénticas y las células policlonales con regiones de unión muy diversas.

6. Resultados negativos falsos

40 Los resultados negativos falsos son poco frecuentes en el análisis de transferencia de Southern si se usan sondas de segmentos génicos J apropiadas. Sin embargo, se podrían perder algunos reordenamientos poco comunes (en general reordenamientos no funcionales), tales como los reordenamientos V-D o las deleciones de las regiones J. El análisis de PCR de los genes de Ig y TCR se podría ver dificultado por los resultados negativos falsos debido a la renaturalización inadecuada de los
45 cebadores de PCR aplicados a los segmentos génicos reordenados. Esta renaturalización de cebadores inadecuada puede estar provocada por dos fenómenos diferentes. En primer lugar, la detección precisa de todos los segmentos génicos V, D, y J requeriría muchos cebadores diferentes (Tabla 1), lo cual no es factible en la práctica. Por lo tanto, se diseñan cebadores de familias, que reconocen específicamente la mayoría o todos los miembros de una familia particular de V, D, o J. De manera alternativa, se usan
50 cebadores consenso, que se supone que reconocen prácticamente todos los segmentos génicos V y J del locus en estudio. Los cebadores de familias y en particular los cebadores consenso son generalmente óptimos para una parte de los segmentos génicos relevantes, pero muestran una homología menor (70 al 80%) hacia otros segmentos génicos. Esto puede conducir finalmente a resultados negativos falsos, en particular en los genes de Ig/TCR con muchos segmentos génicos diferentes. En los genes *TCRG* y
55 *TCRD*, este problema es mínimo, debido al número limitado de segmentos génicos diferentes.

El segundo fenómeno es la incidencia de hipermutaciones somáticas en los genes de Ig reordenados de las neoplasias malignas de células B foliculares y post-foliculares, en particular las neoplasias malignas de células B con genes *IGH* de clase cambiada.

Un conocimiento y una experiencia suficientes pueden evitar las cuatro primeras dificultades, porque se refieren principalmente a problemas de interpretación. Las dos últimas dificultades se refieren a problemas técnicos, que se pueden resolver eligiendo técnicas fiables para el análisis de los productos de PCR y mediante el diseño de grupos de cebadores mejores.

- 5 La optimización del análisis de transferencia de Southern de los genes de Ig/TCR durante los últimos diez años ha dado como resultado la selección de combinaciones fiables de enzimas de restricción (fragmentos de entre 2 y 15 kb, evitando sitios de restricción polimórficos) y sondas (principalmente en posición 3' de los segmentos génicos J). Aunque el análisis de transferencia de Southern es una técnica "de referencia" sólida, muchos laboratorios han sustituido gradualmente el análisis de transferencia de Southern por la técnica de PCR, debido a que la PCR es rápida, requiere
- 10 cantidades mínimas de ADN de calidad media, y tiene una buena sensibilidad global.

A pesar de las desventajas obvias, la sustitución del análisis de transferencia de Southern por las técnicas de PCR para los estudios fiables de Ig/TCR está dificultada por dos problemas técnicos principales:

- 15 - resultados negativos falsos debidos a una renaturalización de cebadores inadecuada;
- dificultades en la distinción entre los reordenamientos de los genes de Ig/TCR monoclonales y policlonales.

- 20 Varios laboratorios de diagnóstico individuales trataron de resolver los problemas de los estudios de clonalidad basados en PCR, pero hasta ahora no se han obtenido protocolos de PCR estandarizados de manera fiable. En contraste, se están usando muchos grupos de cebadores diferentes, que difieren en su sensibilidad y en su aplicabilidad.

- 25 La presente invención proporciona ahora grupos de cebadores de amplificación de ácido nucleico y protocolos de PCR estandarizados para detectar esencialmente todos los loci de Ig y TCR relevantes y dos anomalías cromosómicas que se dan con frecuencia. Los grupos de cebadores según la invención que comprenden un cebador directo e inverso son capaces de amplificar reordenamientos clonales de los genes de la cadena pesada de Ig (*IGH*). Además, se describen cebadores capaces de amplificar reordenamientos de los genes de la cadena kappa de Ig (*IGK*), los genes de la cadena lambda de Ig (*IGL*), los genes de TCR beta (*TCRB*), los genes de TCR gamma (*TCRG*), y los genes de TCR delta (*TCRD*) o de amplificar la translocación cromosómica t(11;14)(*BCL1-IGH*) y t(14;18)(*BCL2-IGH*). Los
- 30 cebadores permiten que sean detectables tanto los reordenamientos completos como los incompletos, y que se puedan reconocer los segmentos génicos de las diferentes familias de V, (D), y J.

- 35 Dos técnicas que se pueden usar en un método de la invención para la distinción entre los reordenamientos de los genes de Ig/TCR monoclonales y policlonales son el análisis heterodúplex y el análisis GeneScan. El análisis heterodúplex usa productos de PCR bicatenarios y aprovecha la ventaja de la longitud y la composición de las regiones de unión, mientras en el análisis GeneScan se separan los productos de PCR monocatenarios en un gel o polímero de alta resolución según su longitud únicamente (Figura 2).

- 40 Se proporcionan 107 cebadores específicos diferentes para todos los loci de Ig/TCR relevantes así como para t(11;14) (*BCL1-IGH*) y t(14;18) (*BCL2-IGH*) (véanse las Figuras 3 a 11). Además, un cebador puede comprender un cebador marcado (de manera diferencial), es decir, un cebador que tiene un marcador que se puede identificar o distinguir de otros marcadores por cualquier medio, que incluye el uso de un instrumento analítico. Los ejemplos de cebadores marcados de manera diferencial son los cebadores provistos de un marcador fluorescente tal como un colorante 6-FAM, HEX, TET o NED. Los cebadores marcados de la invención son ventajosos en particular para el uso en el análisis de fragmentos de PCR de alta resolución automatizado (tecnología GeneScan) para la detección de productos de PCR. Tal como se ejemplifica más adelante, los cebadores marcados de manera diferencial permiten distinguir diferentes productos de amplificación de PCR de aproximadamente la misma longitud (tamaño), preferiblemente mediante el uso del análisis GeneScan multi-color. Por supuesto, un cebador de amplificación de ácido nucleico, ya sea un cebador directo o inverso (marcado con colorante), no debería ser capaz de formar dímeros con cualquier otro cebador de amplificación de ácido nucleico directo y/o inverso que se use en una reacción de amplificación, ya que esto puede interferir con la renaturalización de los cebadores a un locus seleccionado como objetivo, y así con la amplificación del reordenamiento o la translocación de interés.
- 50

- 55 En una realización, la invención proporciona un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos, preferiblemente un ensayo de PCR, mediante el uso de al menos un grupo de cebadores según la invención. Dicho ensayo de PCR puede ser una PCR simple (monoplex) o una PCR multiplex. En una realización preferida, se usa un grupo de cebadores según la invención en un ensayo de PCR multiplex estandarizado, mediante el uso, por ejemplo, de dos o más cebadores directos, o tres o cuatro cebadores directos junto con uno o más cebador(es) inverso(s) consenso. Los cebadores de familia de la invención se diseñan de tal manera que reconocen la mayoría o todos los segmentos génicos de una familia
- 60

particular (véase la Tabla 2). En una realización específica, se usan los 107 cebadores en solamente 18 tubos de PCR multiplex: 5 para *IGH* (3x V_H-J_H y 2x D_H-J_H), 2 para *IGK*, 1 para *IGL*, 3 para *TCRB* (2x $V\beta-J\beta$ y 1x $D\beta-J\beta$), 2 para *TCRG*, 1 para *TCRD*, 3 para *BCL2-IGH*, y 1 para *BCL1-IGH* (Figuras 3 a 11). Tal ensayo permite estudiar reordenamientos clonales y/o anomalías cromosómicas. Además, permite la

5 detección de un trastorno linfoproliferativo. El análisis de PCR multiplex de los cebadores sobre alrededor de 90 linfoproliferaciones definidas mediante transferencia de Southern demostró que en más de un 95% de las muestras los resultados de la transferencia de Southern y de la PCR fueron concordantes.

En otra realización, se proporciona un método para la detección de un reordenamiento, preferiblemente dos o más reordenamientos, seleccionados del grupo que consiste en un reordenamiento de *IGH* V_H-J_H , y opcionalmente un reordenamiento de *IGH* D_H-J_H , un reordenamiento de *IGK* V_K-J_K , un reordenamiento de *IGK* V_K /intrón-Kde, un reordenamiento de *IGL* $V_\lambda-J_\lambda$, un reordenamiento de *TCRB* $V\beta-J\beta$, un reordenamiento de *TCRB* $D\beta-J\beta$, un reordenamiento de *TCRG* $V_\gamma-J_\gamma$, un reordenamiento de *TCRD* $V\delta-J\delta$, un reordenamiento de *TCRD* $D\delta-J\delta$, un reordenamiento de *TCRD* $D\delta-D\delta$, y un reordenamiento de *TCRD* $V\delta-D\delta$, mediante el uso de al menos un grupo de cebadores según la invención. El método puede

15 abarcar la detección de una translocación $t(11;14)(BCL1-IGH)$ o una translocación $t(14;18)(BCL2-IGH)$.

Además, se describen métodos para la detección de al menos uno de los reordenamientos anteriores, y al menos una translocación, mediante el uso de al menos dos grupos de cebadores tal como se proporcionan en la presente memoria.

Se proporciona un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un gen humano seleccionado del grupo que consiste en el gen *AF4* humano (exón 3), el gen *AF4* humano (exón 11), el gen *PLZF1* humano, el gen *RAG1* humano y el gen *TBXAS1* humano (véase la Figura 12). Mediante el uso de uno o más de estos cinco grupos de cebadores que consisten en un cebador directo y un cebador inverso en un ensayo de amplificación de ácido nucleico de la invención, es posible detectar uno o más "Gene(s) de Control" seleccionados del grupo que consiste en el gen *AF4* humano (exón 3), el

25 gen *AF4* humano (exón 11), el gen *PLZF1* humano, el gen *RAG1* humano y el gen *TBXAS1* humano. Tal método de detección se usa de manera ventajosa para determinar la calidad (p.ej. la integridad y la amplificabilidad) de una muestra de ácido nucleico (ADN) extraída o aislada de una muestra biológica, por ejemplo ADN extraído de una muestra incrustada en parafina (véase el Ejemplo 10).

La capacidad de los diferentes grupos de cebadores de amplificar reordenamientos clonales y/o anomalías cromosómicas (translocaciones) se ha analizado en muchos tipos diferentes de linfomas malignos, entre otros el linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, y mieloma múltiple. Se descubrió que un grupo de cebadores es muy útil para el estudio de reordenamientos clonales y/o translocaciones cromosómicas. Pareció que el porcentaje de detección de reordenamientos clonales mediante el uso de los tubos de cebadores multiplex según la invención es inéxigentemente elevado, es

35 decir, al menos del 95%.

El análisis en paralelo de tejidos incrustados en parafina disponibles de las muestras anteriores reveló resultados idénticos en gran medida, si la calidad del ADN de estos tejidos es lo suficientemente elevada, lo que significa que se pueden amplificar fragmentos de al menos 300 pb en una PCR con genes de control diseñada especialmente.

La aplicabilidad de los ensayos de PCR multiplex desarrollados según la invención se determinó en una serie de 50 a 100 casos por tipo de neoplasia maligna linfoide. Siguiendo la revisión del panel de patología nacional, y la revisión del panel de patología central en caso de dificultades, todos los casos incluidos se definieron según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las categorías diagnósticas estudiadas incluyeron neoplasias malignas tales como linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma difuso de células B grandes, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma de células T periféricas, y linfoma anaplásico de células grandes, así como lesiones reactivas. Los resultados muestran un nivel muy elevado de detección de clonalidad, incluso en entidades que se sabe que albergan hipermutaciones somáticas tales como el linfoma folicular y el linfoma difuso de células B grandes. En particular, el uso de los tres tubos de V_H-J_H de *IGH*, complementados con los dos tubos de D_H-J_H de *IGH* y los dos tubos de *IGK* pareció ser muy eficaz en la detección de los reordenamientos clonales de los genes de Ig. Esta eficacia elevada se obtiene mediante la complementariedad de los tubos de Ig, así como por el hecho de que los reordenamientos D_H-J_H e *IGK*-Kde no (o casi nunca) están mutados somáticamente. También se halló tal complementariedad para los cebadores de *TCRB* y *TCRG* en el caso de las neoplasias malignas de

55 células T.

Además, se observaron patrones de reordenamientos interesantes e inesperados, tales como reordenamientos entre linajes poco habituales. Sorprendentemente, en alrededor de un 10% de las lesiones reactivas se detectaron reordenamientos clonales. Estas linfoproliferaciones reactivas incluyeron linfoproliferaciones relacionadas con EBV e hiperplasias atípicas como la enfermedad de Castleman, así como lesiones que fueron sospechosas para un clon de células B o T.

60

En una realización específica, se proporciona un método para la detección de la enfermedad residual mínima (ERM). La expresión enfermedad residual mínima (ERM) describe una situación en la que, tras la quimioterapia para una leucemia aguda (LA), una médula ósea morfológicamente normal todavía puede albergar una cantidad relevante de células malignas residuales. La detección de la enfermedad residual mínima (ERM) es una nueva herramienta práctica para una medida más exacta de la inducción de la remisión durante la terapia, debido a que los blastos leucémicos se pueden detectar hasta 10^{-4} - 10^{-6} . El análisis de la ERM basado en PCR conocido usa los reordenamientos de receptores de antígenos clonales detectables en ~90-95% de las muestras de pacientes investigadas. Sin embargo, la amplificación de productos policlonales conduce a menudo a amplicones de PCR positivos falsos que no son adecuados para el análisis de la ERM. Se describe un método para la detección de los genes de Ig y TCR reordenados de manera idéntica (clonalmente) o la detección de anomalías cromosómicas bien definidas y frecuentes, tales como t(11;14), y t(14;18). Así, los reordenamientos y las translocaciones detectadas mediante el uso de un grupo de cebadores de la invención no solamente sirven como marcadores de la clonalidad en el diagnóstico, sino también como objetivos de la PCR para la detección de la ERM durante el seguimiento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un equipo (diagnóstico) para la detección de al menos un reordenamiento de *IGH* V_H-J_H y opcionalmente un reordenamiento de *IGH* D_H-J_H, un reordenamiento de *IGK* V_K-J_K, un reordenamiento de *IGK* V_K/intrón-Kde, un reordenamiento de *IGL* V_L-J_L, un reordenamiento de *TCRB* V_β-J_β, un reordenamiento de *TCRB* D_β-J_β, un reordenamiento de *TCRG* V_γ-J_γ, un reordenamiento de *TCRD* V_δ-J_δ, un reordenamiento de *TCRD* D_δ-J_δ, un reordenamiento de *TCRD* D_δ-D_δ, un reordenamiento de *TCRD* V_δ-D_δ y/o al menos una translocación seleccionada de t(11;14)(*BCL1-IGH*) y t(14;18)(*BCL2-IGH*), que comprende al menos un grupo de cebadores según la invención. Un equipo de la invención es muy adecuado para el diagnóstico de la clonalidad basado en PCR. De forma opcional, tal equipo también comprende al menos un grupo de cebadores capaces de amplificar un "gen de control" humano tal como se mencionó anteriormente. La inclusión de uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres de estos grupos de cebadores de genes de control en un Tubo de Control puede ser útil para estimar la calidad de la muestra de ADN a diagnosticar, por ejemplo ADN extraído de un tejido incrustado en parafina.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la distinción rápida de diferentes tipos de reordenamientos de los genes de Ig/TCR en el mismo tubo de PCR multiplex. El análisis GeneScan permite la aplicación de múltiples cebadores conjugados a fluorocromos diferentes en un único tubo. Tal marcaje diferencial de los cebadores se puede usar para una distinción extra entre tipos diferentes de reordenamientos de los genes de Ig o TCR.

El marcaje diferencial de los cebadores V en general tiene un valor añadido limitado, pero el marcaje diferencial de los cebadores de 3' puede facilitar la identificación rápida y sencilla del tipo de reordenamiento de los genes de Ig/TCR, lo cual es útil para la detección basada en PCR de la enfermedad residual mínima.^{44, 45} No se considera que el marcaje de los cebadores J sea informativo para *IGH* (V_H-J_H o D_H-J_H), *IGK* (V_K-J_K), o *IGL* (V_L-J_L). Para la identificación rápida de los reordenamientos *IGK*-Kde, podría ser interesante distinguir entre los reordenamientos V_K-Kde e intrón-RSS-Kde mediante el marcaje diferencial de los cebadores de Kde y de RSS intrón (véase la Figura 5B).

Se puede diseñar el análisis GeneScan multicolor más informativo para los reordenamientos de los genes de TCR, lo que facilita el reconocimiento rápido de los diferentes tipos de reordenamientos de los genes *TCRB*, *TCRG*, y *TCRD*. Por ejemplo, el marcaje diferencial de los cebadores J_β1 y J_β2 en el Tubo A de *TCRB* (véase la Figura 7B) permite la identificación sencilla de los reordenamientos V_β-J_β1 frente a V_β-J_β2 policlonales y monoclonales (Figura 13A). El marcaje diferencial de los cebadores J_γ1.3/2.3 y J_γ1.1/2.1 (Figura 8B) da como resultado la identificación sencilla de los diferentes tipos de reordenamientos del gen *TCRG* (Figura 13B). El marcaje diferencial de los cebadores J_δ, cebador D_δ2, y cebador D_δ3 en el tubo de *TCRD* (Figura 9B) da como resultado la identificación sencilla de los reordenamientos del gen *TCRD* más relevantes, tales como los reordenamientos D_δ2-J_δ, V_δ-J_δ, D_δ2-D_δ3, y V_δ2-D_δ3 (Figura 13C).

Estos tubos de PCR multiplex multicolor parecen ser sencillos y cómodos en la práctica diaria del diagnóstico de la clonalidad basado en PCR.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de las etapas secuenciales de reordenamiento, transcripción, y traducción del gen *TCRB*. En este ejemplo primero se da un reordenamiento de D_β2 a J_β2.3, seguido por un reordenamiento de V_β4 a D_β2-J_β2.3, lo que da como resultado la formación de una unión codificante V_β4-D_β2-J_β2.3. El gen *TCRB* reordenado se transcribe en mRNA precursor, se somete a corte y empalme hasta el mRNA maduro, y finalmente se traduce en una cadena de proteína TCR_β. También están indicados los dos círculos de escisión de TCR extracromosómicos (TRECs) que se forman durante este proceso de recombinación; contienen la señal de unión D-J y la señal de unión V-D, respectivamente.

Figura 2. Diagrama esquemático del análisis heterodúplex y del análisis GeneScan de productos de PCR obtenidos de los genes de Ig y TCR reordenados. **A.** Los genes de Ig y TCR reordenados (*IGH* en el ejemplo) muestran regiones de unión heterogéneas con respecto al tamaño y a la composición de nucleótidos. Los nucleótidos de la línea germinal de los segmentos génicos V, D, y J se proporcionan en mayúsculas grandes, y los nucleótidos insertados al azar en mayúsculas pequeñas. La heterogeneidad de la región de unión se emplea en el análisis heterodúplex (tamaño y composición) y en el análisis GeneScan (tamaño solamente) para distinguir entre los productos procedentes de las poblaciones celulares linfoides monoclonales y policlonales. **B.** En el análisis heterodúplex, los productos de PCR se desnaturalizan térmicamente (5 min, 94 °C) y posteriormente se enfrían rápidamente (1 hora, 4 °C) para inducir la formación de moléculas dobles (homo- o heterodúplex). En las muestras celulares que consisten en células linfoides clonales, los productos de PCR de los genes *IGH* reordenados dan lugar a moléculas homodúplex tras la desnaturalización y la renaturalización, mientras en las muestras que contienen poblaciones celulares linfoides policlonales los fragmentos de PCR monocatenarios formarán principalmente moléculas heterodúplex, lo que da como resultado una mancha de fondo de fragmentos que migran lentamente en la electroforesis. **C.** En el análisis GeneScan, los productos de PCR marcados con fluorocromos de genes *IGH* reordenados se desnaturalizan antes del análisis de los fragmentos de alta resolución de los fragmentos monocatenarios resultantes. Las muestras de células monoclonales darán lugar a productos de PCR de tamaños idénticos (pico único), mientras en las muestras policlonales se formarán muchos productos de PCR de *IGH* diferentes, que muestran una distribución de tamaños Gaussiana característica.

Figura 3. Análisis de PCR de reordenamientos de *IGH* (VH-JH). **A.** Diagrama esquemático del complejo génico *IGH* en la banda cromosómica 14q32.3 (adaptado de la base de datos de ImMunoGeneTics).^{46, 47} Solamente se incluyen los segmentos génicos VH no polimórficos reordenables en azul (VH funcional), o en gris (pseudogenes reordenables). No están indicados los pseudogenes VH (generalmente truncados) descubiertos recientemente. **B.** Diagrama esquemático del reordenamiento VH-JH de *IGH* con tres grupos de cebadores VH y un cebador consenso JH, combinados en tres tubos multiplex. La posición relativa de los cebadores VH y JH se proporciona según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) de la RSS implicada. El segmento génico VH usado como miembro de la familia VH representativo para el diseño de los cebadores se indica entre paréntesis. **C, D, y E.** Análisis heterodúplex y análisis GeneScan de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales, que muestra las típicas manchas heterodúplex y las bandas homodúplex (paneles de la izquierda) y las típicas curvas policlonales Gaussianas y picos monoclonales (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 4. Análisis de PCR de reordenamientos de *IGH* (D_H-J_H). **A.** Diagrama esquemático de un reordenamiento de *IGH* (D_H-J_H) con siete cebadores de la familia D_H y un cebador consenso JH, dividido en dos tubos (tubos de *IGH* D y E). El cebador D_H7 (7-27) se separó de los otros seis cebadores D_H, debido a que el cebador D_H7 y el cebador consenso JH proporcionarán un producto de PCR de la línea germinal de 211 nt. La posición relativa de los cebadores D_H y JH se proporciona según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) de la RSS implicada. El segmento génico D_H usado como miembro representativo de la familia D_H para el diseño de cebadores se indica entre paréntesis. **B y C.** Análisis heterodúplex (paneles de la izquierda) y análisis GeneScan (paneles de la derecha) de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales. Se indica la distribución aproximada de los picos policlonales y monoclonales. La banda/pico de fondo potencial en el tubo D se indica con un asterisco, y está localizada fuera del intervalo esperado de reordenamientos D_H-J_H. La banda D_H7-J_H de la línea germinal del tubo E también se indica con un asterisco.

Figura 5. Análisis de PCR de los reordenamientos del gen *IGK*. **A.** Diagrama esquemático del complejo génico *IGK* en la banda cromosómica 2p11.2 (adaptado de la base de datos de ImMunoGeneTics).^{46, 47} Solamente se indican los segmentos génicos Vk no polimórficos reordenables en azul (Vk funcional) o en gris (Vk no funcional). La agrupación de segmentos génicos Vk invertidos (codificados con la letra D) está localizada ~800 kb en dirección 5' de los segmentos génicos Vk sin invertir. Estos segmentos génicos Vk de 5' se presentan en forma de una imagen especular respecto de sus correspondientes equivalentes sin invertir. **B.** Diagramas esquemáticos del reordenamiento Vk-Jk y de los dos tipos de reordenamientos Kde (Vk-Kde e intrón-RSS-Kde). La posición relativa de los cebadores Vk, Jk, Kde e intrón-RSS (INTR) se proporciona según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) de la RSS implicada. El segmento génico Vk usado como miembro representativo de las familias Vk1, Vk2, y Vk3 se indica entre paréntesis. Vk4, Vk5, y Vk7 son familias Vk de un único miembro. Los cebadores se dividen en dos tubos: tubo A con cebadores Vk y Jk y tubo B con cebadores Vk, intrón-RSS, y Kde. **C y D.** Análisis heterodúplex y análisis GeneScan de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales, que muestran las típicas manchas heterodúplex y las bandas homodúplex (paneles de la izquierda) y las típicas curvas Gaussianas y picos monoclonales (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 6. Análisis de PCR de los reordenamientos del gen *IGL*. **A.** Diagrama esquemático del complejo génico *IGL* en la banda cromosómica 22q11.2 (adaptado de la base de datos de ImMunoGenetics).⁴⁶ Solamente se incluyen los segmentos génicos Vλ no polimórficos reordenables en azul (Vλ funcional) o en gris (Vλ no funcional). **B.** Diagrama esquemático del reordenamiento Vλ-Jλ con dos cebadores de la familia Vλ y un cebador consenso Jλ. Se diseñaron solamente dos cebadores Vλ para Vλ1 más Vλ2 y para Vλ3, debido a que estas tres familias Vλ cubren aproximadamente el 70% de los segmentos génicos Vλ reordenables, y debido a que aproximadamente el 90% de todos los reordenamientos génicos de *IGL* implican los segmentos génicos Vλ1, Vλ2, o Vλ3.⁴⁸ Aunque cinco de los siete segmentos génicos Jλ se pueden reordenar, solamente se diseñó un único cebador consenso Jλ para Jλ1, Jλ2, y Jλ3, debido a que el 98% de todos los reordenamientos del gen *IGL* implican uno de estos tres segmentos génicos.⁴⁹ La posición relativa de los cebadores Vλ y Jλ se proporciona según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) de la RSS implicada. **C.** Análisis heterodúplex y análisis GeneScan de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales, que muestra las típicas manchas heterodúplex y bandas homodúplex (panel de la izquierda) y las curvas Gaussianas policlonales y picos monoclonales (panel de la derecha). La posición aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 7. Análisis de PCR de los reordenamientos del gen *TCRB*. **A.** Diagrama esquemático del locus de *TCRB* humano. La denominación de los segmentos génicos es según Arden et al.⁵⁰ con la denominación según Rowen et al.⁵¹ y Lefranc et al.^{46, 47} entre paréntesis. La figura está adaptada de la base de datos de ImMunoGeneTics internacional.^{46, 47} Solamente se representan los segmentos génicos Vβ no polimórficos reordenables en azul (Vβ funcional), en mitad azul/mitad gris (potencialmente funcional, pero no se halla expresión de proteína) y en gris (Vβ no funcional). **B.** Diagrama esquemático de los reordenamientos Vβ-Jβ y Dβ-Jβ. Los 23 cebadores Vβ, 13 cebadores Jβ y dos cebadores Dβ se combinan en tres tubos: tubo A con 23 cebadores Vβ y nueve cebadores Jβ, tubo B con 23 cebadores Vβ y cuatro cebadores Jβ, y tubo C con dos cebadores Dβ y 13 cebadores Jβ. Los 23 cebadores Vβ y los 13 cebadores Jβ están alineados para obtener productos de PCR de tamaños comparables (véanse los paneles C y D). Los cebadores Vβ cubren aproximadamente un 90% de todos los segmentos génicos Vβ. La posición relativa de los cebadores Vβ, Dβ, y Jβ se proporciona según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) en la RSS implicada. **C, D, y E.** Análisis heterodúplex y análisis GeneScan de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales, que muestran las típicas manchas heterodúplex y bandas homodúplex (paneles de la izquierda) y las típicas curvas Gaussianas policlonales y picos monoclonales (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 8. Análisis de PCR de los reordenamientos del gen *TCRG*. **A.** Diagrama esquemático del locus de *TCRG* humano en la banda cromosómica 7p14. Solamente se representan los segmentos génicos Vy reordenables en azul (Vy funcional) o en gris (Vy no funcional). Para los segmentos génicos Jy, se usan ambas nomenclaturas.^{46, 47, 52} **B.** Diagrama esquemático del reordenamiento Vy-Jy de *TCRG* con cuatro cebadores Vy y dos cebadores Jy, que se dividen en dos tubos. La posición relativa de los cebadores Vy y Jy se indica según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) en la RSS implicada. **C y D.** Análisis heterodúplex y análisis GeneScan de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales, que muestran las típicas manchas heterodúplex y bandas homodúplex (paneles de la izquierda) y las típicas curvas Gaussianas policlonales y picos monoclonales (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 9. Análisis de PCR de los reordenamientos del gen *TCRD*. **A.** Diagrama esquemático del locus de *TCRD* humano en la banda cromosómica 14q11.2. Los seis segmentos génicos Vδ "clásicos" se indican en azul, dispersos entre los segmentos génicos Vα en negro. Debido a que Vδ4, Vδ5, y Vδ6 se consideran también segmentos génicos Vα, su código de gen Vα se proporciona entre paréntesis. **B.** Diagrama esquemático de los reordenamientos Vδ-Jδ, Dδ2-Jδ, Dδ2-Dδ3, y Vδ-Dδ3, que muestra la posición de seis cebadores Vδ, cuatro Jδ, y dos Dδ, todos combinados en un único tubo. La posición relativa de los cebadores Vδ, Dδ, y Jδ se indica según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) en la RSS implicada. **C.** Análisis heterodúplex (panel de la izquierda) y análisis GeneScan (panel de la derecha) de las mismas poblaciones celulares policlonales y monoclonales. Las poblaciones celulares policlonales muestran una mancha borrosa en el análisis heterodúplex y un patrón de picos complejo y ancho en el análisis GeneScan. Las bandas y picos monoclonales son claramente visibles. Se indica la posición aproximada de los productos de PCR de los diferentes tipos de reordenamientos en el análisis GeneScan.

Figura 10. Detección de los reordenamientos de *BCL1-IGH*. **A.** Diagrama esquemático del gen *CCND1* y de la región del punto de ruptura de *BCL1* MTC en la banda cromosómica 11q13, así como el segmento génico JH en la banda cromosómica 14q32. Para el diseño de cebadores en la región *BCL1*-MTC, se compuso una secuencia de unión artificial *BCL1*-MTC/JH4 (tal como se informó parcialmente para JVM2⁵³): los primeros 50 nucleótidos informados por Williams⁵⁴ se unieron a los nucleótidos 1-439 de la secuencia MTC presente en el NCBI (número de acceso S77049⁵⁵); la región N "GCCC" de JVM2⁵³ se añadió seguida por los nucleótidos 1921-3182 que representan la región genómica de JH4-JH6 (número

de acceso J00256). **B.** Electroforesis en gel de agarosa de una serie de productos de PCR de *BCL1*-IGH de diferentes pacientes de LCM y la línea de células de control positiva JVM2. Los productos de PCR difieren en el tamaño, lo que indica diferentes posiciones de los puntos de ruptura de *BCL1*-MTC. Las bandas más grandes de densidad más baja representan productos de PCR que se extienden hasta el siguiente segmento génico JH de la línea germinal en 3'.

Figura 11. Detección mediante PCR de reordenamientos de *BCL2*-IGH. **A.** Diagrama esquemático del gen *BCL2* en la banda cromosómica 18q21. La mayoría de los puntos de ruptura de *BCL2* se agrupan en tres regiones: MBR, 3' MBR, y mcr. Por lo tanto, se han diseñado cebadores multiplex para cubrir los puntos de ruptura potenciales en estas tres regiones: dos cebadores MBR, cuatro cebadores 3' MBR, y tres cebadores mcr. La posición relativa de los cebadores *BCL2* se indica según su nucleótido más en 5' en dirección 5' (-) o 3' (+) respecto del extremo 3' del exón 3 de *BCL2* (según el número de acceso de NCBI AF325194S1), excepto para dos cebadores *BCL2*-mcr; su posición se indica en dirección 3' del primer nucleótido de la secuencia de AF275873. **B, C, y D.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de diferentes pacientes de LCF y diversas líneas de células de control positivas (DoHH2, K231, OZ, y SC1). Los paneles B y D contienen las mismas muestras y muestran complementariedad en la positividad, lo que ilustra que el tubo C (tubo mcr) tiene un valor añadido. Los productos de PCR difieren en el tamaño, lo que está relacionado con una posición diferente de los puntos de ruptura de *BCL2*. Las bandas más grandes de densidad más baja en los mismos carriles representan productos de PCR que se extienden al siguiente segmento génico JH de la línea germinal en dirección 3' o al siguiente cebador de *BCL2* en 5'.

Figura 12. PCR con genes de control para el estudio de la amplificabilidad y la integridad de las muestras de ADN. **A.** Diagrama esquemático de cinco exones de genes de control y los cinco grupos de cebadores para obtener productos de PCR de 600 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, y 100 pb. La posición relativa de los cebadores de los genes de control se proporciona según su nucleótido más en 5' en dirección 3' del sitio de corte y empalme de 5' del exón del gen de control implicado. **B.** Productos de PCR de genes de control de seis muestras de ADN, separados en un gel de poliacrilamida del 6%. Dos muestras de control contuvieron ADN de peso molecular elevado (carriles externos) y cuatro muestras de ADN se obtuvieron a partir de muestras de tejidos incrustados en parafina, que mostraban una amplificabilidad reducida (p.ej. 50 ng de GBS-4 frente a 500 ng de GBS-4) o una integridad reducida del ADN (PT-4).

Figura 13. Análisis GeneScan multicolor para respaldar la identificación rápida y sencilla de los reordenamientos de los genes de TCR. **A.** Análisis de dos colores del tubo A de *TCRB* con un marcaje diferencial de los cebadores J β 1 (marcados con TET; verde) y de los cebadores J β 2 (marcados con FAM; azul). El panel superior muestra los dos patrones de reordenamientos J β 1 y J β 2 policlonales (compárese con la Figura 7C), mientras los otros dos paneles muestran reordenamientos J β 2 clonales. **B.** Análisis de dos colores del tubo A de *TCRG* con marcaje diferencial del cebador J γ 1.3/2.3 (marcado con FAM; azul) y el cebador J γ 1.1/2.1 (marcado con TET; verde). El panel superior muestra los patrones de reordenamiento policlonales (compárese con la Figura 8C), mientras los otros dos paneles muestran los reordenamientos J γ 1.3/2.3 clonales y J γ 1.1/2.1 clonales, respectivamente. **C.** Análisis de tres colores de los reordenamientos del gen *TCRD* con el marcaje diferencial de los cebadores J δ (marcado con FAM; azul), cebador D δ 2 (marcado con HEX; verde) y cebador D δ 3 (marcado con NED; negro). Dentro de los patrones de reordenamientos complejos del tubo de *TCRD* (Figura 9C), el análisis de tres colores permite la detección directa de los reordenamientos V δ -J δ (pícos azules), los reordenamientos D δ 2-J δ (pícos azules y verdes, que no co-migran completamente debido a diferencias en la velocidad de migración de los dos fluorocromos), el reordenamiento V δ 2-D δ 3 (pícos negros), y el reordenamiento D δ 2-D δ 3 (pícos verdes y negros que co-migran).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los objetivos de PCR: enfoque en la complementariedad

Se decidió enfocarse en la disponibilidad de al menos un objetivo de clonalidad detectable mediante PCR en cada neoplasia maligna linfóide. En las neoplasias malignas de células B maduras este enfoque se podría ver dificultado por la existencia de hipermutaciones somáticas en los genes de Ig, que se hallan en particular en las neoplasias malignas de células B foliculares y post-foliculares. Por lo tanto, se decidió incluir objetivos de PCR que tuvieran cierto grado de complementariedad.

Se usaron varios fundamentos para la selección de los objetivos:

- genes *IGH*: se incluyeron no solamente reordenamientos V_H-J_H completos, sino también reordenamientos D_H-J_H incompletos como objetivos de PCR, debido a que los reordenamientos D_H-J_H probablemente no se ven afectados por las hipermutaciones somáticas;
- genes *IGK* e *IGL*: se incluyeron ambos genes de las cadenas ligeras de Ig como objetivos de PCR, debido a que esto incrementa la probabilidad de hallar un reordenamiento de los genes de Ig detectable mediante PCR en cada neoplasia maligna de células B maduras;

- 5 - genes *IGK*: se incluyeron no solamente los reordenamientos V_k - J_k , sino también los reordenamientos del elemento de delección kappa (Kde), debido a que se dan en uno o ambos alelos en (prácticamente) todas las neoplasias malignas de células B $Ig\lambda^+$ y en un tercio de las neoplasias malignas de células B $Ig\kappa^+$, y debido a que los reordenamientos de Kde probablemente no se ven afectados por la hipermutación somática;
- genes *TCRB*: se incluyeron tanto los reordenamientos $V\beta$ - $J\beta$ completos como los $D\beta$ - $J\beta$ incompletos, debido a que los reordenamientos del gen *TRCB* completos e incompletos se dan en todas las neoplasias malignas de células T $TCR\alpha\beta^+$ maduras y también en muchas neoplasias malignas de células T $TCR\gamma\delta^+$;
- 10 - genes *TCRG*: este objetivo de clonalidad de PCR clásica es útil en todas las neoplasias malignas de células T del linaje $TCR\gamma\delta$ y $TCR\alpha\beta$.
- genes *TCRD*: este es un objetivo potencialmente útil en las neoplasias malignas de células T inmaduras así como en las neoplasias malignas de células T $TCR\gamma\delta^+$;
- 15 - genes *TCRA*: este gen no se incluyó como objetivo de PCR, debido a su grado elevado de complejidad con ~50 segmentos génicos V y 61 segmentos génicos J. Además, todas las neoplasias malignas de células T con reordenamientos del gen *TCRA* contienen reordenamientos del gen *TCRB* y generalmente también tienen reordenamientos del gen *TCRG*;
- segmentos génicos funcionales: las linfoproliferaciones más sospechosas afectan a los linfocitos maduros, que por lo tanto tienen reordenamientos de los genes de Ig o TCR funcionales. Por lo tanto, el diseño de los cebadores de PCR se enfocó en la inclusión de (prácticamente) todos los segmentos génicos de Ig/TCR funcionales.
- 20 - anomalías cromosómicas bien definidas: se incluyeron t(11;14) con *BCL1-IGH* y t(14;18) con *BCL2-IGH* como objetivos adicionales, debido a que estas dos anomalías son detectables mediante PCR con frecuencias relativamente elevadas en linfomas, es decir, en el 30% de los linfomas de células del manto (LCM) y en el 60 al 70% de los linfomas de células foliculares (LCF), respectivamente.
- 25

Diseño de cebadores para PCR multiplex

La detección precisa de todos los segmentos génicos V, D, y J en los genes de Ig y TCR reordenados requeriría muchos cebadores diferentes (Tabla 2). Para algunos complejos génicos esto podría ser posible (p.ej. *TCRG* y *TCRD*), pero para otros loci esto es imposible en la práctica debido al número elevado de diferentes segmentos génicos. Para resolver este problema, se pueden diseñar cebadores de familias que reconocen la mayoría o todos los segmentos génicos de una familia particular (Tabla 2). De manera alternativa, se pueden producir cebadores consenso que reconocen secuencias conservadas que se dan en muchos o en todos los segmentos génicos implicados.

El diseño de cebadores de familias y de cebadores consenso se equilibra entre un número limitado de cebadores y una homología máxima con todos los segmentos génicos relevantes. En este estudio, se planteó el enfoque en la homología máxima con todos los segmentos génicos relevantes (en particular los segmentos génicos funcionales) para evitar una renaturalización de los cebadores subóptima, que podría provocar resultados negativos falsos. Además, el estudio se enfocó en el diseño de cebadores de familias específicos sin renaturalización cruzada con otras familias.

Para limitar el número de tubos de PCR por locus, se hizo importante la multiplexación de los cebadores de PCR por razones prácticas. Por lo tanto, se desarrollaron directrices especiales para asegurar posibilidades máximas para el diseño de los cebadores útiles en los tubos de PCR multiplex. Para este fin, el Dr. W. Rychlick (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) proporcionó su programa informático OLIGO 6.2 especialmente adaptado y prestó su ayuda en el desarrollo de las directrices para el diseño de cebadores óptimos.

Las directrices generales para el diseño de cebadores fueron las siguientes:

- 50 - la posición de los cebadores se debería elegir de tal manera que el tamaño de los productos de PCR fuera preferiblemente <300 pb (preferiblemente 100 a 300 pb) para poder usar un material incrustado en parafina;
- se debería tener en cuenta una distancia mínima hasta la región de unión de preferiblemente >10-15 pb (para evitar negativos falsos debidos a la imposibilidad de que el extremo 3' del cebador renaturalice con el objetivo reordenado debido a una delección de nucleótidos de la secuencia de la línea germinal);
- 55 - preferiblemente, los cebadores no deberían ser demasiado largos (p.ej. <25 nucleótidos).

Se usaron los siguientes parámetros para el diseño de cebadores con el programa OLIGO 6.2:

- la búsqueda de cebadores se debería llevar a cabo con una rigurosidad moderada;
- el valor de eficacia del cebador (PE) debería ser preferiblemente ~400 (y >630, si el cebador se va a usar también como cebador consenso para otros segmentos génicos);
- 5 - el dímero de 3' más estable de los cebadores superior/superior, inferior/inferior, o superior/inferior no debería superar -4 Kcal (estrategia de búsqueda moderada); y el total del dímero más estable es menos importante;
- en vista de la PCR multiplex, se tuvieron en cuenta las siguientes directrices: se tendría que diseñar un cebador común en la región de mayor consenso (es decir, PE elevado en la búsqueda de consenso), mientras los cebadores individuales (familia o miembro) se tendrían que diseñar en la
- 10 - la región de menor consenso (es decir, valor de PE bajo de ese cebador para los segmentos génicos que no se deberían cubrir) para evitar la renaturalización cruzada con otros segmentos génicos y por lo tanto productos de PCR múltiples (indeseados).

Protocolo de PCR

- 15 Se desarrolló un protocolo de PCR estandarizado basado en la experiencia preexistente de estudios de colaboración europeos. Tras el análisis inicial y la aprobación, el protocolo se aceptó tal como se resume en la Tabla 3.

Técnicas para el análisis de los productos de PCR obtenidos de reordenamientos de los genes de Ig/TCR

- 20 Los productos de PCR obtenidos de los reordenamientos de los genes de Ig y TCR se tienen que analizar para la distinción entre las células linfoides monoclonales con regiones de unión idénticas y las células linfoides policlonales con regiones de unión muy diversas.

- Basándose en la experiencia combinada de los laboratorios participantes, se seleccionaron dos técnicas: el análisis heterodúplex (HD) y el análisis GeneScan (GS). El análisis HD usa productos de PCR bicatenarios y aprovecha la longitud y la composición de las regiones de unión, mientras que en el análisis
- 25 GS se separan productos de PCR monocatenarios en un gel o polímero de alta resolución según su longitud solamente (Figura 2).

Análisis heterodúplex de los productos de PCR

- Los productos de PCR obtenidos con cebadores sin marcar se desnaturalizan a temperatura elevada (~95 °C durante 5 min), seguido por una renaturalización aleatoria rápida a temperatura baja
- 30 (preferiblemente a 4 °C durante 1 hora). Esta formación forzada de moléculas dobles da como resultado muchas moléculas heterodúplex muy diferentes con una velocidad de migración diferente en el caso de las linfoproliferaciones policlonales, pero que da como resultado moléculas homodúplex con una migración idénticamente rápida en el caso de las linfoproliferaciones monoclonales. La electroforesis de las moléculas homodúplex en un gel de poliacrilamida del 6% da como resultado una única banda de tamaño
- 35 predecible, mientras las moléculas heterodúplex forman una mancha en una posición superior (Figura 2). La técnica heterodúplex es rápida, simple y barata (véase la Tabla 4 para los detalles técnicos) y tiene un límite de detección del ~5%.^{40, 41} La detección está influida por la frecuencia de los linfocitos policlonales, debido a que la formación de muchas moléculas heterodúplex consumirá también una parte de los productos de PCR monoclonales.⁴¹

- 40 *Análisis GeneScan de los productos de PCR*

Los cebadores de PCR para el análisis GeneScan tienen que marcarse con un fluorocromo para permitir la detección de los productos de PCR con un equipo de secuenciación automatizada (Figura 2).

- Los productos de PCR monocatenarios (desnaturalizados) marcados con fluorocromo se separan por tamaños en un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturizante o en un polímero de
- 45 secuenciación capilar y se detectan por medio del barrido automatizado con un láser (véase la Tabla 5 para los detalles técnicos). Esto da como resultado una distribución Gaussiana con múltiples picos, que representan muchos productos de PCR diferentes en el caso de las linfoproliferaciones policlonales, pero proporciona un único pico que consiste en un tipo de producto de PCR en el caso de una linfoproliferación completamente monoclonal (Figura 2).

- 50 El análisis GeneScan es rápido y relativamente simple, pero necesita un equipo caro. El análisis GeneScan es generalmente más sensible que el análisis heterodúplex y puede alcanzar sensibilidades del 0,5 al 1% de células linfoides clonales.

Genes de control y tejidos incrustados en parafina

- 55 En varios países europeos, el material de tejido reciente no está fácilmente disponible para el diagnóstico molecular, tal como los estudios de clonalidad basados en PCR. Por lo tanto, uno de los

objetivos del presente estudio fue desarrollar una estrategia para los estudios de clonalidad basados en PCR en tejidos incrustados en parafina.

5 Para controlar la calidad y la amplificabilidad del ADN del material incrustado en parafina, se desarrolló una PCR con genes de control multiplex especial, lo que dio como resultado una escalera de cinco fragmentos (100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, y 600 pb). En 45 de los 90 casos anteriormente descritos estuvo disponible un tejido incrustado en parafina suficiente para la extracción de ADN. Estas muestras de ADN se analizaron en paralelo a las muestras de ADN recién obtenidas, mediante el uso del tubo multiplex de Gen de Control así como los tubos multiplex Ig/TCR/BCL1/BCL2 para el diagnóstico de la clonalidad (véase el Ejemplo 10).

10 **EJEMPLO 1. Reordenamientos del gen *IGH* completo: V_H-J_H**

Antecedentes

15 El reordenamiento funcional del gen *IGH*, primero D_H a J_H y posteriormente V a D_H-J_H , va seguido por la expresión de anticuerpos, el sello de las células B maduras. El gen *IGH* está localizado en el cromosoma 14q32.3 en un área que cubre aproximadamente 1250 kilobases. Se han identificado 46 a 52 segmentos V_H funcionales (dependiendo del alotipo del individuo), que se pueden agrupar según su homología en seis o siete subgrupos de V_H . Además, se han descrito aproximadamente 30 segmentos V_H no funcionales. Además, se han descubierto de manera consistente 27 segmentos D_H y seis segmentos J_H funcionales (Tabla 2 y Figura 3A).⁵⁶

20 Los segmentos V_H contienen tres regiones estructurales (FR) y dos regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (Figura 3B). Las FRs se caracterizan por su similitud entre los diversos segmentos V_H , mientras las CDRs son muy diferentes incluso dentro de la misma familia de V_H . Además, las CDRs representan las secuencias objetivo preferidas para las hipermutaciones somáticas en el transcurso de la reacción en los centros germinales, lo que incrementa la variabilidad dentro de esas regiones. Aunque las FRs normalmente se ven menos afectadas por las mutaciones somáticas, también se pueden dar sustituciones de nucleótidos dentro de estas regiones, en especial en células B que experimentan un proceso de mutación intensa.

25 Las regiones $V-D-J_H$ muy variables se pueden amplificar mediante PCR para detectar poblaciones de células B clonales indicativas de la presencia de un trastorno maligno de las células B. Las células B clonales se pueden distinguir de las células B policlonales (es decir, tejidos linfoides normales o reactivos) basándose en el tamaño y la composición idénticas de los productos de PCR clonales en comparación con los muchos productos de PCR policlonales diferentes con un intervalo de tamaños de aproximadamente 60 pb, dispuestos en una distribución Gaussiana. Las estrategias basadas en PCR para la detección de las poblaciones de células B clonales en cortes histológicos y suspensiones celulares ya se establecieron a principio de los años noventa. Sin embargo, los protocolos de PCR 30 iniciales usaban cebadores consenso de V_H simples que eran capaces de unirse a una de las tres regiones estructurales, principalmente FR3. Tales cebadores consenso no eran adecuados para amplificar todos los segmentos V_H con la misma eficacia, lo que conducía a la ausencia de detectabilidad de un número significativo de reordenamientos clonales. Además, las mutaciones somáticas introducidas en el transcurso de la reacción en los centros germinales no se limitan a las CDRs, sino que también pueden ocurrir en las FRs, por lo que se impide la renaturalización de los cebadores y por lo tanto conduce a la ausencia de productos de PCR clonales a pesar de la presencia de una población de células B neoplásicas. Esto es especialmente cierto para los linfomas foliculares, los linfomas difusos de células B grandes, y los mielomas múltiples que normalmente contienen un número elevado de mutaciones somáticas.

35 Para incrementar adicionalmente la tasa de detección de la PCR de *IGH*, se han hecho varios intentos de diseñar cebadores específicos de familias para superar las limitaciones de los cebadores consenso. Sin embargo, estos cebadores específicos de familias se basan en gran medida en las secuencias de los cebadores consenso previos. Aunque estas estrategias de PCR han ayudado a mejorar la tasa de detección, todavía existe la necesidad de sistemas de cebadores que sean menos sensibles a las hipermutaciones somáticas, permitiendo así la amplificación de (prácticamente) todos los reordenamientos $V-D-J_H$ posibles.

Diseño de cebadores

40 Según las directrices descritas, se diseñaron tres grupos de cebadores V_H con la ayuda del programa OLIGO 6.2 que correspondían a las tres regiones estructurales de V_H (FR1, FR2 y FR3) (Figura 3B). Cada grupo de cebadores consistió en seis o siete oligonucleótidos capaces de renaturalizar con sus segmentos V_H correspondientes (V_H1 a V_H7) sin emparejamientos incorrectos para la mayoría de los segmentos V_H y uno o como mucho dos emparejamientos incorrectos para algunos segmentos V_H poco frecuentes. El diseño se hizo de tal manera que los emparejamientos incorrectos estuviesen localizados en el mismo extremo 5' del cebador. Estos grupos de cebadores V_H se usaron junto con un único cebador consenso J_H , diseñado para renaturalizarse con el extremo 3' más homólogo de los seis segmentos J_H , 45

aproximadamente 35 pb en dirección 3' desde la RSS de JH. Esto asegura que todos los segmentos JH son detectables con la misma eficacia de unión, y que la unión del cebador no se verá afectada fácilmente por una delección de nucleótidos extensa en el transcurso del proceso de reordenamiento. Además, no hubo renaturalización cruzada entre los cebadores VH y el cebador JH, tal como se estudió mediante el programa OLIGO 6.2.

El cebador JH se diseñó también para ser usado para la amplificación de otros objetivos de PCR, tales como los reordenamientos D_H-J_H incompletos así como t(11;14) (*BCL1-IGH*) y t(14;18) (*BCL2-IGH*). Esto permite la detección de diferentes productos de PCR mediante análisis GS empleando el mismo cebador J_H marcado.

10 Resultados de la fase de análisis inicial

El análisis inicial de la PCR de V_H-J_H recién diseñada se realizó mediante la aplicación separada de cada cebador V_H junto con el cebador JH en una PCR individual. Para este fin, se usó ADN extraído de líneas de células B así como muestras de pacientes clonales bien definidas. Además, se analizó la sensibilidad de los reordenamientos clonales mediante dilución en serie en ADN extraído de amígdalas reactivas. Las muestras de control clonales no estaban disponibles para cada reordenamiento de *IGH* posible, pero se han incluido todos los segmentos V_H principales y varios segmentos VH reordenados de manera poco frecuente en la fase de análisis inicial.

Todos los pares de cebadores funcionaron con una eficacia y sensibilidad elevadas. Los reordenamientos VH clonales esperados fueron detectables, y la sensibilidad fue de al menos un 1% (10⁻²). No hubo señal de fondo dentro del intervalo de tamaños esperado, y la amplificación del ADN de amígdala proporcionó la curva de distribución Gaussiana esperada. (Figuras 3C, D, y E).

Basándose en estos resultados, se comenzó la siguiente fase del análisis de cebadores inicial combinando los cebadores VH en tres grupos, cada uno específico de una de las tres regiones estructurales, que se usaron junto con el cebador JH común (Figura 3B). Los resultados fueron los mismos que los obtenidos con los pares de cebadores simples, pero con una sensibilidad ligeramente menor. Además, no se amplificaron productos inespecíficos dentro del intervalo de tamaños esperado, con la excepción de un producto de PCR de 340 pb que apareció en la PCR multiplex de FR1. Este producto de PCR se generó independientemente de la fuente de ADN (linfoide y no linfoide) usada para la PCR, a la vez que no se obtuvo producto de PCR cuando no se aplicó un molde de ADN. Además, este amplicón solamente fue detectable en el análisis heterodúplex, no en el análisis GeneScan. Esto indica que el cebador JH marcado con fluorescencia no estuvo implicado en la generación de este producto de PCR. El análisis de la secuencia de este producto de PCR reveló un fragmento VH4 amplificado por el cebador VH4 de FR1 junto con el cebador V_H2 de FR1 que actuó aparentemente como cebador de 3' uniéndose a la secuencia intrónica de V_H4. Este problema se pudo resolver diseñando un nuevo cebador VH2 de FR1 que estaba localizado 25 pb en dirección 5' respecto del sitio de unión del cebador previo.

35 Resultados de la fase de análisis general

La PCR de *IGH* aprobada se aplicó a las 90 muestras de ADN definidas mediante transferencia de Southern, que procedían de casos bien caracterizados. Seis de los 11 laboratorios implicados en la fase de análisis general llevaron a cabo un análisis GS de los productos de PCR, y cinco llevaron a cabo análisis HD. Además de diversas muestras policlonales, también se incluyeron muestras monoclonales (ADN de línea celular) como controles. 45 de estos casos exhibieron productos de PCR dominantes tras el análisis GS, y 40 casos tras la detección mediante HD, lo que indicaba la presencia de una población de células B monoclonales. Los reordenamientos clonales fueron detectables con los tres grupos de cebadores FR en 33 de los 45 casos clonales (GS) y en los 12 restantes con uno o dos de los tres grupos de cebadores FR. Se concluyó que la mayoría de los casos negativos estaban provocados por hipermutaciones somáticas en el sitio de unión del cebador, lo que impedía la renaturalización del cebador y así la amplificación.

La comparación de los resultados de PCR de V_H-J_H con los resultados de transferencia de Southern reveló un grado elevado de concordancia. Un 85% (46 de 55) y 76% (42 de 55) de las muestras con genes V_H reordenados mediante análisis de transferencia de Southern mostraron un producto de amplificación dominante mediante análisis GS y análisis HD, respectivamente. Al revés, todas las muestras excepto dos que albergaban genes V_H de la línea germinal mediante transferencia de Southern exhibieron un patrón policlonal mediante análisis GS y HD.

55 Conclusión

En conclusión, las tres PCRs multiplex para la detección de reordenamientos V_H-J_H clonales proporcionan un ensayo nuevo y fiable para identificar proliferaciones de células B clonales. El uso combinado de los cebadores estandarizados en las tres FRs diferentes ayuda a disminuir la tasa de resultados negativos falsos debidos a hipermutación somática en los sitios de unión de los cebadores de los segmentos génicos V_H implicados.

EJEMPLO 2. Reordenamientos del gen *IGH* incompletos: D_H-J_HAntecedentes

La formación de reordenamientos V-D-J completos en el locus de *IGH* en el cromosoma 14q32.3 es un proceso secuencial que se da en dos etapas: el acoplamiento de V_H va precedido generalmente por un reordenamiento inicial entre los segmentos génicos D_H y J_H en las células B precursoras tempranas (revisado por⁵⁷). Además de los muchos segmentos génicos V_H distintos y de los seis segmentos génicos J_H funcionales (véase el Ejemplo 1), el locus de *IGH* humano contiene también 27 segmentos génicos D_H.⁵⁸ Basándose en la homología de secuencias, los 27 segmentos D_H se pueden agrupar en siete familias: D_H1 (anteriormente conocida como DM), D_H2 (DLR), D_H3 (DXP), D_H4 (DA), D_H5 (DK), D_H6 (DN), y D_H7 (DQ52); todas las familias comprenden al menos cuatro miembros, excepto por la séptima, que consiste en el segmento único D_H7-27 justo en posición 5' de la región J_H (Figura 3A).^{58, 59}

La recombinación entre cualquiera de los segmentos D_H y J_H dará como resultado la formación de uniones D_H-J_H incompletas, que se pueden detectar fácilmente en las células B precursoras CD10⁺/CD19⁻ derivadas de médula ósea^{60, 61} y por lo tanto también en un subgrupo (20-25%) de leucemias linfoblásticas agudas de células B precursoras, que muestran un genotipo inmaduro.⁶² La secuenciación reveló la predominancia de los segmentos génicos D_H2 (D_H2-2), D_H3 (D_H3-9), y D_H7-27 en LLA-precursores B, que comprendían un 36%, 33%, y 19% de todos los segmentos identificados, respectivamente.⁶²

Sin embargo, también se han informado reordenamientos D_H-J_H incompletos en las neoplasias malignas de células B maduras.^{61, 63} Además, incluso en un subgrupo de mielomas múltiples negativos para IgH, que se pueden considerar como el tipo más maduro de neoplasia maligna del linaje B, se observaron uniones D_H-J_H.⁶⁴ Estos reordenamientos D_H-J_H procedieron del segundo alelo no codificante e implicaron segmentos de las familias D_H1 a D_H4.⁶⁴ Basándose en la descripción de las uniones D_H-J_H en LLA-precursores B y en mielomas múltiples, se supone que los reordenamientos D_H-J_H incompletos también están presentes en otros tipos de leucemias de células B y linfomas. En las neoplasias malignas de células T inmaduras se han identificado acoplamientos D_H-J_H como reordenamientos entre linajes,³⁴ de manera interesante, esto ocurrió casi exclusivamente en el subgrupo LLA-T no-TCRαβ⁺ más inmaduro e implicó principalmente los segmentos D_H6-19 y D_H7-27 más en dirección 3'. El segundo segmento se usa frecuentemente (hasta un 40%) en las células B fetales, pero poco frecuentemente en las células B de adultos.^{65, 66} Las células B precursoras y maduras de adultos humanos parecen usar principalmente los segmentos de las familias D_H2 y D_H3, tal como se demuestra a partir de las secuencias de los reordenamientos V_H-D_H-J_H completos.⁶⁸

Aunque se desconocen en gran medida las frecuencias exactas de los acoplamientos D_H-J_H incompletos en los diferentes tipos de neoplasias malignas de células B maduras, es evidente que serán al menos menores que las de las uniones V_H-J_H. Sin embargo, los reordenamientos D_H-J_H podrían representar todavía un objetivo complementario importante para el estudio de la clonalidad basado en PCR. Esta supuesta contribución de los reordenamientos D_H-J_H como objetivos de PCR se basa en la suposición de que los reordenamientos incompletos en el locus de *IGH* no contendrán hipermutaciones somáticas, debido a que no se da la transcripción que comienza a partir de los promotores de los segmentos génicos V, lo cual se considera un prerrequisito esencial para que la hipermutación somática tenga lugar.^{67, 68} En especial en aquellos tipos de proliferaciones del linaje B en los que las hipermutaciones somáticas son frecuentes, el análisis mediante PCR de un posible producto de recombinación D_H-J_H, por lo tanto, podría ser relevante, y a veces incluso la única posibilidad de detectar el clon de células B.

Diseño de cebadores

Basándose en el elevado grado de homología dentro de cada familia D_H, se diseñaron siete cebadores D_H específicos de familia (Figura 4) en combinación con el cebador J_H consenso que se usa también para la detección de reordenamientos V_H-J_H (véase el Ejemplo 1) y t(11;14) (*BCL1-IGH*) y t(14;18) (*BCL2-IGH*) (Ejemplos 8 y 9). Los cebadores se diseñaron de manera que la renaturalización cruzada con otros segmentos de la familia D_H sería mínima o preferiblemente inexistente, lo que da como resultado posiciones distintas para los diversos cebadores de familia respecto de los elementos RSS (Figura 4). Los tamaños de los productos de PCR esperados de las uniones D_H-J_H oscilan de 110-130 pb (para las uniones D_H7-J_H) a 395-415 pb (para los reordenamientos D_H3-J_H). Es de destacar que debido a la posición del segmento D_H7-27 cercano a los segmentos de la región J_H, los productos de PCR de 211 pb (y también 419, 1031, 1404, 1804, y 2420 pb en caso de que el cebador renaturalice a los segmentos génicos J_H en 3') se amplificarán a partir de alelos no reordenados, y se detectarán en forma de una escalera de bandas de la línea germinal prácticamente en todas las muestras.

Resultados de la fase de análisis inicial

Para el análisis inicial de los cebadores D_H individuales, se usaron muestras de LLA-precursores B o LLA-T con carga tumoral elevada con reordenamientos D_H-J_H clonales bien definidos. Bajo

condiciones de PCR estándar mediante el uso de $MgCl_2$ 1,5 mM y tampón AmpliTaq Gold, las siete combinaciones de cebadores parecieron detectar los objetivos D_H - J_H clonales con longitudes de los productos dentro de los intervalos de tamaño esperados. La renaturalización cruzada de los cebadores D_H con los segmentos génicos reordenados de otras familias D_H fue muy débil o no se observó en absoluto. Además, también en los productos de PCR de ADN de amígdala sana de control o de ADN de MNC, se observaron productos de PCR en los intervalos de tamaño correctos. No se observó renaturalización inespecífica de los cebadores prácticamente para todos los grupos de cebadores, mediante el uso de ADN de control que no era específico del molde; solamente en el caso del grupo de cebadores D_{H2} / J_H se observó (a veces débilmente) un producto de 340-350 pb en ADN de HeLa. La secuenciación posterior reveló que este producto inespecífico era debido a un cebado falso del cebador D_{H2} a una secuencia de ADN en dirección 5' del segmento J_{H4} . Sin embargo, ya que el tamaño de este producto inespecífico era tan diferente de los tamaños de cualquiera de los productos de PCR de D_H - J_H auténticos, se decidió no diseñar un nuevo cebador D_{H2} . De hecho, la banda inespecífica de 350 pb se puede emplear como un marcador interno de la amplificación eficaz del ADN y por lo tanto de la calidad del ADN molde, que es difícilmente o solo débilmente visible cuando hay disponible suficiente molde de D_H - J_H clonal o policlonal (p.ej. en ADN de amígdala o ADN de muestras leucémicas particulares), pero que es especialmente intensa en muestras que contienen un número bajo de células linfoides con reordenamientos D_H - J_H .

Las diluciones en serie de ADN de las muestras de referencia clonales en ADN de amígdala dio como resultado en general sensibilidades del 5% o menores (0,5-1% en el caso del reordenamiento D_{H6} - J_H) mediante el uso del análisis HD; las sensibilidades en el análisis GS fueron en general 1-2 etapas de dilución mejores, es decir 1% o menos. El objetivo D_{H7} - J_H clonal se pudo detectar solamente con una sensibilidad del ~10%, lo cual está muy probablemente provocado por el consumo de cebadores en amplicones de PCR que implican los segmentos génicos D_{H7} y J_H de la línea germinal sin reordenar.

Aunque la estrategia multiplex inicial, como indicó el diseño de cebadores asistido por OLIGO 6.2, fue dividir los diversos cebadores D_H en dos tubos, después de analizar diversas aproximaciones multiplex se decidió combinar todos los cebadores en un tubo multiplex (tubo D del ensayo de clonalidad de *IGH*), excepto para el cebador D_{H7} , que se incluyó en un tubo distinto (tubo E del ensayo de clonalidad de *IGH*). La razón para excluir el cebador D_{H7} fue el patrón complejo de la línea germinal, debido a la amplificación sencilla de alelos con segmentos D_{H7} sin reordenar. Mediante el uso de esta aproximación multiplex de dos tubos, todavía fueron detectables todas las muestras de referencia clonales. En las condiciones multiplex, los límites de detección para estos diversos objetivos clonales fueron lógicamente menos óptimos en comparación con los ensayos simples, y oscilaron de ~5% (D_{H3} , D_{H4} , y D_{H6}) a 10% (D_{H2} , y D_{H5}). Para la muestra la referencia clonal D_{H1} que estaba disponible, se observó una sensibilidad del ~20%; en una etapa posterior, se descubrió que el reordenamiento D_{H1} - J_H de la línea celular KCA era detectable hasta un 10% en el ensayo multiplex. Debido a que el tubo E contiene solamente el cebador D_{H7} , la sensibilidad del 10% para este tubo fue la misma que se mencionó anteriormente. El mismo análisis multiplex, llevado a cabo con 500 ng en vez de 100 ng de ADN de las diluciones en serie, dio como resultado sensibilidades ligeramente mejores. El uso de diluciones en serie en ADN de MNC en vez de ADN de amígdala no afectó claramente a los límites de detección de los ensayos de las recombinaciones D_H - J_H .

Resultados de la fase de análisis general

Tras el análisis inicial en los tres laboratorios implicados en el diseño de cebadores, el ensayo de PCR multiplex de D_H - J_H de *IGH* desarrollado se estudió adicionalmente mediante el uso de las 90 muestras definidas mediante transferencia de Southern. Cada muestra se analizó en paralelo en cuatro laboratorios mediante análisis HD y en cinco laboratorios mediante análisis GS; en otros dos laboratorios se analizaron todas las muestras mediante ambas técnicas. En conjunto, se obtuvieron en total resultados de seis análisis HD y siete análisis GS por muestra por tubo. A pesar de los resultados concordantes (>80% de laboratorios con resultados idénticos) en la gran mayoría de las muestras, nueve mostraron discordancias entre los laboratorios en el tubo D. El análisis posterior reveló que éstos se podían explicar por la presencia de un pequeño clon con productos clonales débiles, o a productos de gran tamaño (~390 y mayores). En unos cuantos casos, los productos fueron tan grandes, que solamente tras la secuenciación se pudo aclarar que estaban relacionados con reordenamientos D_H - J_H auténticos pero prolongados, desde los segmentos génicos D_H en 5' (p.ej., D_{H6} -25- D_{H1} -26- J_H en NL-12) o desde J_H en 3' (p.ej. D_{H6} -25- J_{H4} - J_{H5} en PT-14). En los tres casos (NL-17, micosis fungoide; FR-1, LLC-B; FR-5, LCF) en los que se hallaron productos clonales mediante el uso del tubo E, los resultados fueron completamente concordantes entre los laboratorios.

Cuando se estudiaron los resultados de los análisis HD y GS, pareció que éstos eran comparables, aunque en general el número de laboratorios que mostraron resultados idénticos fue ligeramente superior en el análisis HD en comparación con el análisis GS (Figuras 4B y C).

La comparación directa de los resultados de PCR multiplex de D_H - J_H con los datos de SB es prácticamente imposible, ya que la hibridación con una única sonda ($IGHJ6$) en la región J_H no permite la

distinción entre los reordenamientos VH-JH y DH-JH. En tres muestras fue evidente que la detección de los productos clonales de los ensayos VH-JH y DH-JH combinados no se ajustó a la configuración del locus de *IGH* en el análisis SB. De manera notable, no se observaron productos de PCR de DH-JH clonales en las neoplasias malignas de células B pre-foliculares. En contraste, las muestras 11/16 de LLC-B y 12/25 de neoplasia maligna de células B (post-)foliculares contuvieron productos de PCR de DH-JH reordenados clonalmente. En tres de los dieciocho casos de neoplasia maligna de células T se observaron reordenamientos DH-JH clonales; éstos estuvieron asociados a los casos de T-LBL (ES-9) y micosis fungoide (NL-17) con reordenamientos de *IGH* detectados mediante SB, y a un caso de LNH-T/LTAE (PT-4) sin reordenamientos de *IGH* detectados mediante SB, probablemente debido a la baja carga tumoral de <15%. Los 15 casos reactivos mostraron solamente productos de PCR de DH-JH policlonales, de acuerdo con los resultados de SB. En la categoría D con diagnósticos difíciles, tres muestras (PT-12, GBS-10, y GBN-8) mostraron productos de PCR de DH-JH de *IGH* clonales, lo cual estuvo de acuerdo con los datos de SB así como con los datos de PCR de *IGK* en dos de tres casos; en otras dos muestras (PT-6 y GBS-9), ambos casos de LNH-B ricos en células T, se hallaron productos de DH-JH clonales además de productos de *IGK* y/o *IGL* clonales, pero sin signos de clonalidad a partir del análisis SB, lo que se podría explicar mejor por el pequeño tamaño del clon de células B en estas muestras.

Para determinar el valor adicional del análisis de PCR de DH-JH, los resultados se compararon con los del análisis de PCR de VH-JH. En cinco neoplasias malignas de células B (NL-4, PT-14, GBN-2, FR-7, NL-12) se hallaron productos de PCR de DH-JH clonales, mientras se observaron solamente productos de PCR de V_H-J_H policlonales.

Conclusión

En conclusión, basándose en las fases de análisis inicial y general, el análisis mediante PCR de DH-JH parece tener valor añadido para el estudio de la clonalidad. Aunque los resultados del análisis HD se podrían interpretar de manera ligeramente más sencilla, no existe una preferencia clara por el análisis HD o GS ya que ambos son adecuados para analizar los productos de PCR amplificados. Una dificultad potencial en el análisis de PCR de DH-JH es el intervalo de tamaños relativamente grande de los productos de PCR esperados, debido a las posiciones dispersas de los cebadores y a las amplificaciones prolongadas desde los segmentos génicos DH en 5' o JH en 3', lo que implica que se recomiendan tiempos de funcionamiento largos para los análisis GS. Finalmente, la posición notable del segmento génico DH7-27 en el locus de *IGH* provoca una escalera de productos de amplificación de la línea germinal en el tubo E, y los productos clonales son fácilmente reconocibles en forma de bandas / picos mucho menores.

EJEMPLO 3: Reordenamientos del gen *IGK*: V_k-J_k, V_k-Kde / Intrón-RSS-Kde

Antecedentes

El locus de la cadena ligera de *IGK* humana (en el cromosoma 2p11.2) contiene muchos segmentos génicos V_k diferentes, agrupados en siete familias génicas V_k, así como siete segmentos génicos J_k en dirección 5' de la región C_k. En un principio, los segmentos génicos V_k se designaron según la nomenclatura descrita por Zachau et al.⁶⁹ Una nomenclatura alternativa agrupa los segmentos génicos V_k en siete familias, y se usa en la base de datos ImMunoGeneTics.⁴⁸ En el presente documento se utiliza la segunda nomenclatura. Las familias V_k1, V_k2, y V_k3 son familias de múltiples miembros que incluyen segmentos génicos funcionales y pseudo-segmentos génicos, mientras las otras familias solamente contienen un único segmento (V_k4, V_k5, V_k7) o unos cuantos segmentos (V_k6).⁷⁰ De manera notable, todos los segmentos génicos V_k están dispersos a lo largo de dos grandes agrupaciones duplicadas, una inmediatamente en posición 5' y en la misma orientación que los segmentos J_k, y la otra más distal y en una orientación invertida (Figura 5A).⁷¹ Lo último implica que los denominados reordenamientos por inversión necesitan formar uniones V_k-J_k que implican genes V_k de la agrupación distal. Además de los segmentos V_k y J_k, existen otros elementos en el locus de *IGK* que pueden estar implicados en la recombinación. El elemento de delección kappa (Kde), aproximadamente 24 kb en dirección 3' de la región J_k-C_k, se puede reordenar hasta los segmentos génicos V_k (V_k-Kde), pero también hasta una RSS aislada en el intrón de J_k-C_k (intrón-RSS-Kde).^{24, 72} Ambos tipos de reordenamientos conducen a la inactivación funcional del alelo de *IGK*, por medio de la delección del exón de C_k (reordenamiento intrón-RSS-Kde) o del área completa J_k-C_k (reordenamiento V_k-Kde).

Debido a que la recombinación de *IGK* humano comienza en las células B precursoras en la médula ósea, los reordenamientos de *IGK* también se pueden detectar en las leucemias agudas de células B precursoras (30-45% de los alelos, dependiendo de la edad). Aunque las uniones V_k-J_k están presentes, estos reordenamientos de *IGK* afectan principalmente a recombinaciones que implican Kde (25-35% de los alelos). En la infancia, la recombinación V_k-Kde de LLA-precursores B predomina sobre intrón-Kde, mientras en LLA de adultos las delecciones afectan exclusivamente a los acoplamientos V_k-Kde.^{24, 73, 74} En las leucemias de células B crónicas los reordenamientos de *IGK* son aún más frecuentes, y son detectables en el 75% (casos Igk⁺) o incluso en el 95% (casos Igλ⁺) de todos los alelos de *IGK*. Por

definición, se hallan reordenamientos Vk-Jk funcionales en al menos un alelo en las leucemias de células B Igk⁺; el segundo alelo no codificante está en la configuración de la línea germinal, o inactivado por medio de la recombinación Vk-Kde (8% de los alelos) o intrón-RSS-Kde (8% de los alelos). Los reordenamientos Kde son frecuentes en las leucemias de células B Igλ⁺ (~85% de los alelos), con una ligera predominancia de las recombinaciones intrón-RSS-Kde sobre los reordenamientos Vk-Kde. Esto implica que prácticamente todas las leucemias Igλ⁺ contienen un reordenamiento Kde, mientras todos los acoplamientos Vk-Jk potencialmente funcionales son relativamente poco frecuentes.^{24, 75} Varios estudios han demostrado que el uso del segmento génico Vk es casi idéntico entre diversas poblaciones de células B normales y malignas, y refleja en gran medida el número de segmentos génicos disponibles dentro de cada familia. Tanto en los reordenamientos Vk-Jk como en los reordenamientos Vk-Kde, predominan los segmentos génicos Vk de las primeras cuatro familias (Vk1 a Vk4). El uso del gen Vk2 pareció ser mayor en LLA-precursores B que en las linfoproliferaciones de células B más maduras o en las células B normales. De manera notable, la agrupación de Vk invertida distal se usó de manera poco frecuente en los reordenamientos Vk-Jk, mientras los segmentos pseudogénicos Vk nunca estuvieron implicados, tampoco en los casos Igλ⁺.⁷⁶ Se sabe poco sobre el uso del segmento génico Jk, pero los escasos datos muestran que Jk1, Jk2, y Jk4 son los segmentos génicos Jk usados más frecuentemente.⁷⁵

Los reordenamientos Vk-Jk pueden ser un objetivo de PCR complementario importante para aquellos tipos de proliferaciones de células B en los que las hipermutaciones somáticas pueden dificultar la amplificación del objetivo VH-JH, pero las recombinaciones que implican Kde probablemente son aún más valiosas. La delección de las secuencias intermedias en el intrón de Jk-Ck da como resultado la eliminación del potenciador de *IGK*, lo cual se cree que es esencial para que se dé el proceso de hipermutación somática. Por lo tanto, se asume que los reordenamientos que implican Kde están exentos de hipermutaciones somáticas, y por lo tanto se deberían amplificar de manera bastante fácil.

Diseño de cebadores

Se diseñaron seis cebadores Vk específicos de familia mediante el uso del programa informático OLIGO 6.2 para que reconociesen los diversos segmentos génicos Vk de las siete familias Vk; los segmentos génicos de la familia Vk6 estuvieron cubiertos por el cebador de la familia Vk1 (Figura 5B). En el caso de las familias Vk1, Vk2, y Vk3 relativamente grandes, solamente se tomaron en consideración los segmentos génicos Vk funcionales, ya que los segmentos pseudo-génicos menos homólogos complicaron demasiado el diseño de cebadores óptimos. Los cebadores Vk específicos de familia se diseñaron para usarlos en combinación con un grupo de dos cebadores Jk (Jk1-4, que cubrían los primeros cuatro segmentos Jk y Jk5 que cubría el quinto) o un cebador Kde (Figura 5B). Para el análisis de los reordenamientos de Kde, se produjo un cebador directo adicional que reconocía una secuencia en posición 5' de intrón-RSS. Para demostrar la renaturalización cruzada mínima con otros segmentos de la familia Vk y para que todavía fueran útiles en las reacciones multiplex, los diversos cebadores no se pudieron diseñar en posiciones similares respecto de los elementos de RSS (Figura 5B). Los tamaños de los productos de PCR esperados de las uniones Vk-Jk oscilan de ~115-135 pb (para las uniones Vk7-Jk) a ~280-300 pb (reordenamientos Vk2-Jk). Para los reordenamientos de Kde, los intervalos de los tamaños de los productos son de ~195-215 pb (Vk7-Kde) a ~360-380 pb (Vk2-Kde), mientras los productos de intrón-RSS-Kde son de ~275-295 pb.

Resultados de la fase de análisis inicial

Para el análisis inicial de los cebadores individuales, se usaron varias líneas celulares y muestras de pacientes con reordenamientos Vk-Jk, o Vk-Kde/intrón-RSS-Kde clonales definidos con precisión. Las muestras de pacientes con uniones Vk-Jk estuvieron relacionadas en su mayor parte con leucemias de células B crónicas, que se seleccionaron adicionalmente en base a una carga tumoral elevada para una detección fácil y sensible del reordenamiento implicado. Desafortunadamente, no hubo disponibles muestras de referencia clonales para todos los objetivos Vk-Jk; en especial, los tipos más infrecuentes de reordenamientos que implicaban Vk5, Vk7 y/o Jk5 no estuvieron representados en las series de muestras de referencia. Para estos objetivos y también para los objetivos para los cuales había muestras de referencia clonales, se emplearon muestras de ADN de amígdala de control sana o de ADN de MNC, en las que se observaron los productos de PCR de los tamaños correctos esperados. La única excepción fue la combinación de cebadores Vk7 / Jk5; muy probablemente, las uniones Vk7-Jk5 son tan infrecuentes en las células B normales que estos productos de PCR fueron difícilmente detectables o indetectables en las amígdalas. Se pudieron detectar productos reordenados dentro de los intervalos de tamaños esperados en todas las muestras de referencia clonales, en condiciones de PCR estándar mediante el uso de MgCl₂ 1.5 mM y tampón ABI Gold o tampón ABI II. Sin embargo, en unos cuantos casos, se observó un amplificación débil de reordenamientos Vk-Jk particulares con otros grupos de cebadores de la familia de Vk / Jk, debido a una ligera renaturalización cruzada del cebador Vk3 con unos cuantos segmentos génicos Vk1. Además, en algunas de las muestras de referencia clonales se observaron productos de PCR clonales adicionales evidentes con otros grupos de cebadores Vk/Jk o incluso Vk/Kde e intrón-RSS/Kde; en la mayoría de las muestras esto se pudo explicar por la configuración completa de los dos alelos de *IGK*. Esta existencia de múltiples productos de PCR clonales ilustra la complejidad de los

patrones de reordenamiento de *IGK* en una muestra celular dada, principalmente provocada por la existencia potencial de dos reordenamientos clonales en un alelo (*Vk-Jk* e intrón-RSS-Kde). Esta complejidad no dificulta, sino que respalda, la distinción entre la policlonalidad y monoclonalidad.

5 Se observó la renaturalización inespecífica de los cebadores para cada uno de los grupos de cebadores *Vk-Jk* y *Vk-Kde* / intrón-RSS-Kde, al usar ADN de HeLa como control que no era específico del molde. Las diluciones en serie de ADN de las muestras de referencia clonales en ADN de amígdala dio como resultado generalmente sensibilidades del 5-10 % para los reordenamientos *Vk-Jk* y del 1-10 % para los reordenamientos *Vk-Kde*, mediante el uso del análisis HD. En general, las sensibilidades del análisis GS fueron aproximadamente de una etapa dilución mejores. El único objetivo ligeramente problemático fue el objetivo intrón-RSS-Kde que se pudo detectar solamente hasta la dilución en serie del 10% en la muestra de paciente empleada. Esto está provocado probablemente por el hecho de que los reordenamientos intrón-RSS-Kde son abundantes en el ADN de las células B de amígdala Igk^+ e $Ig\lambda^+$, que se usaron en los experimentos de dilución.

15 La estrategia multiplex que se eligió después de analizar varias aproximaciones consistió en dos tubos de reacción de PCR multiplex diferentes. En el tubo *Vk-Jk* (tubo A) todos los cebadores *Vk* se combinaron con ambos cebadores *Jk*, mientras el tubo B contuvo todos los cebadores *Vk* más el cebador intrón-RSS en combinación con el cebador inverso *Kde* (Figura 5B). Todas las muestras de referencia clonales anteriormente mencionadas fueron detectables mediante el uso de esta aproximación multiplex de dos tubos. Es de destacar la observación de que en las muestras de amígdala no clonales se detectó una banda aparentemente clonal predominante de ~150 pb mediante el uso del análisis con el tubo A multiplex *Vk-Jk*. La presencia de este producto, que se observa en el análisis HD pero en especial en el análisis GS, se puede explicar por la heterogeneidad limitada de las regiones de unión *Vk-Jk*, lo que conduce a una frecuencia elevada de productos de un tamaño medio de ~150 pb. Además, en algunas muestras se observó una banda inespecífica de 404 pb a veces débil en el tubo B. Aunque las sensibilidades fueron como media ligeramente mejores en otras aproximaciones multiplex en las que los cebadores *Vk* se subdividieron adicionalmente en múltiples tubos, la viabilidad de tener solamente dos tubos para analizar todos los reordenamientos *IGK* relevantes, finalmente fue el argumento más importante para elegir la estrategia multiplex de dos tubos tal como se muestra en la Figura 5B. Los límites de detección para los diversos objetivos clonales en la aproximación multiplex de dos tubos fueron del ~10% para la mayoría de los reordenamientos *Vk-Jk* clonales (*Vk1-Jk4*, *Vk2-Jk4*, *Vk3-Jk4*) procedentes de muestras informativas con una elevada carga tumoral; varios de los objetivos *Vk-Kde* fueron detectables con una sensibilidad todavía razonable del ~10%, pero algunas muestras que contenían objetivos *Vk2-Kde*, *Vk5-Kde*, y también intrón-RSS-Kde mostraron límites de detección por encima del 10%. Incluso el uso de 500 ng de ADN diluido en serie en vez de 100 ng difícilmente dio como resultado sensibilidades mejores, mientras las diluciones en serie en ADN de MNC tampoco afectaron a los límites de detección. Sin embargo, los límites de detección de las diluciones en serie del ADN de referencia en agua fueron todos del orden del 0,5-1%, lo que demuestra que el ensayo elegido de PCR multiplex de *IGK* es bueno. Es importante indicar que las poblaciones de células clonales potenciales en nódulos linfáticos o en sangre periférica tendrán que ser detectadas en la práctica en un fondo de células policlonales, lo que puede dificultar la detección sensible de la clonalidad, en especial en muestras con un fondo relativamente elevado de células B policlonales.

Resultados de la fase de análisis general

Tras el análisis inicial en los cuatro laboratorios implicados en el diseño de cebadores, el ensayo de PCR multiplex de *IGK* desarrollado se estudió adicionalmente mediante el uso de 90 muestras definidas mediante transferencia de Southern. Cada muestra se analizó en paralelo mediante análisis HD (cinco laboratorios) y GS (dos laboratorios); en otros cuatro laboratorios se analizaron todas las muestras mediante ambas técnicas. En conjunto, estuvieron disponibles los resultados de ocho análisis HD y cinco análisis GS por muestra por tubo. En la gran mayoría de muestras >80% de los laboratorios produjeron resultados idénticos, es decir, bandas / picos clonales o manchas / curvas policlonales en uno o ambos tubos. Sin embargo, en nueve (~10%) muestras se hallaron discordancias entre los laboratorios, que persistieron tras el análisis repetitivo de estas muestras. Los análisis más detallados revelaron que en al menos seis casos los tamaños de aproximadamente 150 y 200 pb de los productos clonales del tubo A no se pudieron distinguir fácilmente de los productos policlonales de aproximadamente el mismo tamaño. Esta es una dificultad inherente en especial en el análisis de *Vk-Jk*, que está provocada por la heterogeneidad de unión relativamente limitada de estos reordenamientos. En dos muestras los resultados del tubo B fueron tan evidentes en todos los laboratorios con ambas técnicas que de hecho no prevaleció ninguna discrepancia. En una muestra (ES-8) un producto grande de alrededor de 500 pb pareció ser la razón de los resultados discrepantes entre laboratorios; la secuenciación posterior reveló que la amplificación comenzando desde el segmento *Jk* en 3' provocó la producción de un producto de PCR *Vk1-Jk3-Jk4* prolongado.

Cuando se estudiaron los resultados del análisis HD y GS, pareció que estos eran bastante compatibles, aunque en general el número de laboratorios que mostraron resultados idénticos fue

ligeramente superior en el análisis HD en comparación con el análisis GS (Figuras 5C y D). De manera notable, en una muestra (GBS-4) el análisis HD reveló un producto evidente en ambos tubos, mientras el análisis GS mostró solamente policlonalidad. La clonación del producto de HD mostró un producto de PCR Vκ3-Vκ5 peculiar, que no se observó en ninguna otra muestra; la configuración Vκ-Vκ de este producto explicó por qué no se detectaba con los cebadores Jκ marcados en el análisis GS.

La comparación de los resultados de PCR con los datos de SB no reveló discrepancias SB-PCR en las muestras de neoplasias malignas de células B pre-foliculares y LLC-B; de acuerdo con la presencia de bandas de *IGK* reordenadas en el análisis SB, todas las muestras contuvieron productos de PCR de *IGK* clonales. En contraste, en las 25 muestras de neoplasia maligna de células B (post-)foliculares se perdieron los productos de PCR de *IGK* clonales en cuatro casos de LDCG (ES-5, PT-13, PT-14, FR-7) y una leucemia PC (NL-19) con ambas técnicas y en otro caso de LDCG (GBS-4, véase anteriormente) con el análisis GS solo. En todos los casos, esto estuvo provocado muy probablemente por la hipermutación somática. De manera interesante, en un caso de LCF (NL-4), se halló un producto de PCR clonal, mientras el análisis SB reveló una banda de la línea germinal en el caso de los genes *IGK* y bandas clonales débiles en el análisis de *IGH*. En los 18 casos de neoplasias malignas de células T y en los 15 casos reactivos (categoría C) se hallaron productos de PCR de *IGK* policlonales de acuerdo con los resultados de SB, excepto en un caso de LNH-T periférico (FR-10). A continuación de los productos de TCR e *IGK* clonales, esta muestra también mostró productos de PCR de *IGH* e *IGL* clonales, pero no reordenamientos de Ig clonales en el análisis SB, lo que probablemente refleja la presencia de un clon de células B pequeño adicional en esta muestra. Finalmente, en la categoría de diagnóstico difícil (D), dos muestras (GBS-10 y GBN-8) mostraron productos de PCR de *IGK* clonales, de acuerdo con los datos de SB; sin embargo, en otras dos muestras (PT-6 y GBS-9), ambas de casos de LNH-B ricos en células T, se hallaron productos de PCR de *IGK* clonales así como productos de *IGH* y/o *IGL* clonales, pero sin pruebas de clonalidad a partir de los análisis SB. Además, esta discrepancia se puede explicar probablemente por el tamaño pequeño del clon de células B en estas dos muestras de pacientes.

Para determinar el valor adicional de analizar el locus de *IGK*, se compararon los resultados del análisis de PCR de *IGK* con los del análisis de PCR de *IGH*. En cinco (ES-2, NL-4, PT-8, GBN-2, ES-8) de las nueve muestras en las cuales no se hallaron productos de PCR de VH-JH clonales, los productos clonales se observaron fácilmente en el análisis de *IGK*. Teniendo en cuenta tanto el análisis de VH-JH como de DH-JH, el análisis de PCR de *IGK* fue todavía complementario al análisis de PCR de *IGH* en tres de estos casos para detectar productos de PCR de Ig clonales.

Conclusión

En conclusión, basándose en las fases de análisis inicial y general, así como las pruebas preliminares a partir del uso de estos ensayos multiplex en series patológicamente bien definidas de linfoproliferaciones, el análisis de PCR del locus de *IGK* tiene un valor evidente (adicional) para la detección de la clonalidad. No obstante, se debería tener cuidado con la interpretación de las bandas aparentemente clonales especialmente en el tubo A, debido a la heterogeneidad de unión de *IGK* restringida inherente. Ya que este problema es especialmente evidente en el análisis GS, se prefiere ligeramente del análisis HD sobre el análisis GS, aunque se debería indicar que en ciertos casos el análisis GS puede facilitar la interpretación apropiada de los resultados. Otra dificultad potencial es el intervalo de tamaños relativamente grande de los productos de *IGK* reordenados esperados, debido a las posiciones de los cebadores dispersas, y a las amplificaciones prolongadas desde los segmentos génicos Jκ de 3'. Esto implica que se recomiendan tiempos de funcionamiento largos para el análisis GS. Finalmente, la complejidad inherente de los reordenamientos múltiples en el locus de *IGK* (reordenamientos Vκ-Jκ y Kde en el mismo alelo), junto con un nivel bajo de renaturalización cruzada de los cebadores Vκ, puede dar como resultado ocasionalmente patrones con múltiples bandas o picos, que se parecen a la oligoclonalidad. Sin embargo, teniendo en cuenta estas consideraciones, el sistema de PCR multiplex de *IGK* de dos tubos puede ser valioso en el diagnóstico de la clonalidad basado en PCR.

Ejemplo 4. Reordenamientos del gen *IGL*

Antecedentes

Los reordenamientos del gen *IGL* están presentes en el 5 al 10% de las neoplasias malignas de células B Igκ⁺ y en todas las neoplasias malignas de células B Igλ⁺.⁷⁵ Por lo tanto, los reordenamientos Vλ-Jλ representan potencialmente un objetivo extra de PCR atractivo para los estudios de clonalidad para compensar los resultados de PCR de VH-JH de *IGH* negativos falsos, provocados principalmente por las mutaciones somáticas. El locus de *IGL* abarca 1 Mb en el cromosoma 22q11.2.⁷⁷⁻⁷⁹ Hay 73-74 genes Vλ a lo largo de 900 kb, de los cuales 30-33 son funcionales (Figura 6A). Basándose en la homología de secuencias, los genes Vλ se pueden agrupar en 11 familias y tres clanes. Los miembros de la misma familia tienden a estar agrupados en el cromosoma. Los genes Jλ y Cλ están organizados en tándem con un segmento Jλ precediendo a un gen Cλ. Generalmente, hay 7 segmentos génicos J-Cλ, de los cuales J-Cλ1, J-Cλ2, J-Cλ3, y J-Cλ7 son funcionales y codifican los cuatro isotipos de Igλ (Figura 6A).^{80, 81} Sin

embargo, hay una variación polimórfica en el número de segmentos génicos J-C λ , ya que algún individuo puede portar hasta 11 de ellos, debido a una amplificación de la región C λ 2-C λ 3.^{82, 83}

Varios estudios han demostrado que el repertorio de genes *IGL* tanto de las células B normales como de las malignas está sesgado.^{46, 49, 64, 65} Así, más del 90% de los genes V λ usados por las células B normales pertenecen a las familias V λ 1, V λ 2 y V λ 3, lo que constituye el 60% de los genes funcionales. Además, tres genes (2-14, 1-40, 2-8) representan alrededor de la mitad del repertorio expresado. Aunque las células B normales usan los segmentos génicos J-C λ 1, J-C λ 2 y J-C λ 3 en proporciones aproximadamente equivalentes, las células B neoplásicas tienden a usar de manera predominante los segmentos génicos J-C λ 2 y J-C λ 3.⁴⁹ En las células B normales y malignas el J-C λ 7 se usa muy poco frecuentemente (1%). Este último hallazgo fue puesto en duda, sin embargo, por un estudio con una única célula de células normales que descubrió que más de la mitad de los reordenamientos emplearon los segmentos génicos J-C λ 7.⁸⁰ En contraste con el ratón, existe cierta diversidad de unión debido a la actividad exonucleasa y la adición de nucleótidos en N en los reordenamientos del gen *IGL* humano.^{82, 85-87} Sin embargo, es menos exhaustivo que el del locus de *IGH*, y varios reordenamientos resultan del acoplamiento directo de los segmentos génicos V λ y J λ de la línea germinal. No obstante, el locus de *IGL* podría representar un locus complementario alternativo a *IGH* para los estudios de clonalidad de células B.

Diseño de cebadores

Tomando en consideración el repertorio de V λ sesgado, se eligió amplificar solamente los reordenamientos que usan los segmentos génicos V λ 1, V λ 2 y V λ 3. Se diseñó un único cebador consenso que reconoce ambos segmentos génicos V λ 1 y V λ 2, así como un cebador V λ 3, en regiones de homología elevada entre los miembros de la misma familia (Figura 6B). Los experimentos iniciales demostraron que funcionaron tan bien en multiplex como por separado. De hecho, se pudo observar la renaturalización cruzada del cebador V λ 3 que hibridaba a ciertos genes V λ 1 o V λ 2 (o a la inversa) cuando se usaron los cebadores V λ por separado; no se observó, sin embargo, en la PCR multiplex.

Se diseñó un único cebador consenso para los segmentos génicos J λ 1, J λ 2 y J λ 3, y tiene un emparejamiento incorrecto en su porción central en comparación con cada una de las secuencias de la línea germinal. En los experimentos preliminares se descubrió que proporcionaba mejores resultados que una combinación de cebadores J λ 1 y J λ 2-J λ 3 perfectamente emparejados. Debido a que un único estudio informó del uso frecuente del gen J λ 7 en las células B normales,⁸⁸ también se diseñó un cebador J λ 7 específico. Cuando se analizó en varias muestras de células B policlonales, difícilmente se pudo detectar una señal en el análisis HD, en contraste con las amplificaciones llevadas a cabo con las mismas muestras mediante el uso de los cebadores J λ 1, J λ 2-J λ 3 o el cebador J λ consenso. De forma similar, no se pudo detectar ningún reordenamiento con este cebador cuando se analizó una colección de tumores de células B monoclonales. Basándose en estos resultados, así como en los otros informes de la bibliografía⁴⁹, se pudo concluir que la frecuencia elevada sin confirmar de los reordenamientos J λ 7 (en un único estudio)⁸⁸ había sido provocada por una dificultad técnica y, por lo tanto, se decidió no incluir el cebador J λ 7. El ensayo de PCR para la detección de los reordenamientos del gen *IGL* en el estudio de clonalidad, por lo tanto, consiste en un único tubo que contiene tres cebadores (Figura 6B). Se esperó que este único tubo detectase la gran mayoría de los reordenamientos.

Resultados de la fase de análisis inicial

El análisis inicial en un grupo de muestras monoclonales y policlonales demostró que se podrían diferenciar muy bien mediante análisis HD de los productos de PCR en electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (Figura 6C). Los reordenamientos de *IGL* clonales se observaron en la región homodúplex, con una o a veces dos bandas más débiles en la región heterodúplex, mientras los reordenamientos policlonales aparecieron en forma de una mancha en la región heterodúplex (Figura 6C). No se observaron bandas inespecíficas. Se debería indicar que debido al tamaño limitado de la región de unión, es extremadamente difícil distinguir los reordenamientos policlonales de los reordenamientos monoclonales utilizando un simple gel de poliacrilamida sin llevar a cabo una formación heterodúplex. De acuerdo con esto, se demostró que el análisis de los productos de PCR mediante GS fueron menos sencillos (Figura 6C). Aunque se identificaron claramente los reordenamientos monoclonales, el patrón de reordenamientos policlonales tuvo un aspecto oligoclonal debido a la diversidad de unión limitada. La interpretación fue más difícil, en particular para distinguir los casos policlonales de aquellos con una población menor de células B clonales en un fondo de células B policlonales. Por lo tanto, se recomendó el análisis HD como el método de elección para analizar los reordenamientos del gen *IGL*.

La sensibilidad del ensayo, llevado a cabo en varios casos, demostró ser de alrededor del 5% (2,5% - 10%) cuando la dilución del ADN tumoral se realizó en PB-MNC y alrededor del 10% (5% - 20%) cuando se diluyó en ADN de nódulo linfático.

Resultados de la fase de análisis general

El ensayo de PCR de *IGL* en un único tubo se estudió en una serie de 90 proliferaciones linfoides definidas mediante transferencia de Southern. Este análisis se llevó a cabo en nueve laboratorios, cuatro con análisis HD solamente, uno con análisis GS solamente, y cuatro que usaban ambas técnicas. Los reordenamientos del gen *IGL* clonales se detectaron en 19 casos. En 15 de ellos se obtuvo una concordancia de más del 70% en los nueve laboratorios. En cuatro casos se obtuvo una concordancia menor del 70%, que se pudo explicar por los reordenamientos del gen *IGL* clonales menores en tres de ellos (ES-12, GB-10, y FR-10). Esta discordancia en el cuarto caso (PT-11) permanece sin explicar, en particular debido a que no se detectaron reordenamientos del gen *IGL* mediante transferencia de Southern. Tal como se concluyó a partir del análisis inicial, la interpretación del análisis GS fue más difícil que en el análisis HD, en especial en el caso de las poblaciones clonales menores. De estos 19 casos de gen *IGL* clonal, 17 fueron proliferaciones de células B (16 maduras y una de células B precursoras). Un caso (ES12) correspondió a la enfermedad de Hodgkin y otro (FR-10) a un LNH-T. Ambos tuvieron solamente un reordenamiento del gen *IGL* clonal menor, y FR-10 exhibió también un reordenamiento del gen *IGK* clonal.

La comparación con los datos de transferencia de Southern mostraron ciertas discrepancias. Seis casos con reordenamientos del gen *IGL* clonales mediante PCR parecieron policlonales mediante el análisis de transferencia de Southern. Tres de ellos (PT-6, ES-12, FR-10) estaban relacionados con poblaciones clonales menores que pueden haber estado por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica de transferencia de Southern. En los otros tres casos (NL-19, ES-1, PT-11) se puede haber perdido una banda reordenada clonalmente debido al patrón de reordenamiento bastante complejo del locus de *IGL* en la transferencia de Southern.^{26, 49} A la inversa, el ensayo de PCR no fue capaz de detectar los reordenamientos clonales que se observaron mediante el análisis de transferencia de Southern en dos casos (GBS-6, FR-5). Sin embargo, estos fueron linfomas foliculares en los que el grado elevado de hipermutaciones somáticas puede haber evitado la renaturalización de los cebadores del gen *IGL*.

Conclusión

En conclusión, un ensayo de PCR en un único tubo para la detección de los reordenamientos del gen *IGL* que contiene solamente tres cebadores (Figura 6B) permite detectar la gran mayoría de los reordenamientos del gen *IGL* (reordenamientos génicos V λ 1, V λ 2, y V3). El análisis heterodúplex es el método analítico preferido, aunque se puede usar el análisis GeneScan, pero se recomienda una precaución máxima para evitar la sobreinterpretación de la clonalidad debida a la diversidad de unión limitada.

EJEMPLO 5: Reordenamientos del gen *TCRB*: V β -J β , D β -J β

Antecedentes

El análisis molecular de los genes *TCRB* es una herramienta importante para el estudio de la clonalidad en proliferaciones de células T sospechosas. Los reordenamientos del gen *TCRB* ocurren no solamente en la mayoría de las neoplasias malignas de células T maduras, sino también en alrededor del 80% de las leucemias linfoblásticas agudas de células T CD3 negativas (LLA-T) y en el 95% de las LLA-T CD3 positivas.²⁸ Los reordenamientos *TCRB* no se limitan a las neoplasias malignas del linaje T, ya que alrededor de un tercio de las LLA-precursoras B albergan genes *TCRB* reordenados.³⁰ Su frecuencia es mucho menor (0 al 7%) en las proliferaciones de células B maduras.²¹

El locus de *TCRB* humano está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda 7q34, y abarca una región de 685 kb. En contraste con los loci de *TCRG* y *TCRD*, la agrupación génica de la región V del locus de *TCRB* es mucho más compleja (Figura 7A).¹ Contiene alrededor de 65 elementos génicos V β para los cuales se usan dos nomenclaturas diferentes: la resumida por Arden et al.⁵⁰ sigue la denominación génica de Wei et al.⁸⁸ y agrupa los genes V β en 34 familias. La nomenclatura alternativa propuesta por Rowen et al.⁵¹ subdivide 30 subgrupos de genes V β y fue adoptada más tarde por el IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics <http://imgt.cines.fr> (iniciadora y coordinadora: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia). [Lefranc, 2003 #212; Lefranc, 2003 #219] Las familias más grandes, V β 5, V β 6, V β 8 y V β 13 (nomenclatura de Arden) alcanzan un tamaño de siete, nueve, cinco y ocho miembros, respectivamente. Doce familias V β contienen solamente un único miembro. En general, las familias se demarcan claramente entre sí.⁵⁰ En este informe se sigue la nomenclatura de Arden.⁵⁰

39-47 de los elementos génicos V β se califican como funcionales, y pertenecen a 23 familias. 7-9 de los elementos V β no funcionales tienen un marco de lectura abierto, pero contienen alteraciones en los sitios de corte y empalme, las señales de recombinación y/o los elementos reguladores. 10-16 están clasificados como pseudogenes. Además, se ha informado que una agrupación de seis genes V β huérfanos no funcionales están localizados en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21)^{89, 90} No se detectan en los transcritos.^{50, 51}

Todos los genes V β excepto uno están localizados en posición 5' de dos agrupaciones D β -J β -C β . La Figura 7A ilustra que ambos segmentos génicos C β (C β 1 y C β 2) están precedidos por un gen D β (D β 1 y D β 2) y una agrupación J β que comprende seis (J β 1.1 a J β 1.6) y siete (J β 2.1 a J β 2.7) segmentos

J β funcionales. Los loci de la región J β se clasifican en dos familias según su localización genómica, pero no por la similitud de secuencias.^{51, 68, 91}

Debido al gran repertorio codificado por la línea germinal, la diversidad combinatoria de los reordenamientos del gen *TCRB* es extensa en comparación con los reordenamientos de *TCRG* y *TCRD*. El repertorio principal de las moléculas TCR β se amplía adicionalmente por la adición de una media de 3,6 (unión V-D) y 4,6 (unión D-J) nucleótidos y la de delección de una media de 3,6 (V), 3,8 (5' de D), 3,7 (3' de D) y 4,1 (J) nucleótidos.⁵¹ La región hipervariable completa que resulta de la unión de los segmentos V, D y J comprende de manera característica nueve o diez codones. La variación de tamaños es limitada, ya que 7 a 12 residuos explican más del 80% de todos los reordenamientos funcionales en contraste con el repertorio de longitud amplia de la región CDR3 de *IGH*.⁹²

Durante el desarrollo temprano de las células T, el reordenamiento del gen *TCRB* consiste en dos etapas consecutivas: reordenamiento de D β a J β y reordenamiento de V β a D-J β con un intervalo de uno a dos días entre estos dos procesos.⁹³ El segmento génico D β 1 se puede unir a los segmentos génicos J β 1 o J β 2, pero el segmento génico D β 2 se une generalmente solamente a los segmentos génicos J β 2 debido a su posición en el locus del gen *TCRB*.^{28, 51} Debido a la presencia de dos agrupaciones D-J en *TCRB* consecutivas, también es posible que sean detectables dos reordenamientos en un alelo: un reordenamiento incompleto D β 2-J β 2 de *TCRB* además de un reordenamiento completo o incompleto en la región D β 1-J β 1 de *TCRB*.¹

En los reordenamientos del gen *TCRB*, se observa una distribución no aleatoria del uso de los segmentos génicos. En los individuos sanos, ciertas familias V β predominan en el repertorio de células T de sangre periférica (p.ej. V β 1-V β 5), mientras otros se usan de manera infrecuente solamente (p.ej. V β 11, V β 16, V β 18, V β 23). Los valores medios del repertorio de V β parecen ser estables durante el envejecimiento, aunque la desviación estándar se incrementa en los ancianos.^{13, 94} Además, en el timo humano dominan ciertos segmentos génicos V β : los siete genes V β más prevalentes (V β 3-1, V β 4-1, V β 5-1, V β 6-7, V β 7-2, V β 8-2, V β 13-2) cubren casi la mitad del repertorio de *TCRB* funcional.⁸⁵ La representación de segmentos J también está lejos de ser uniforme. La familia J β 2 se usa con más frecuencia que la familia J β 1 (72% frente al 28% de reordenamientos de *TCRB*).⁹⁸ En particular, la proporción de J β 2.1 es mayor de lo esperado (24%) seguida por J β 2.2 (11%) y J β 2.3 y J β 2.5 (10% cada una).⁹⁵

Los patrones de reordenamiento del gen *TCRB* difieren entre las categorías de neoplasias malignas de células T. Los reordenamientos V β -J β 1 de *TCRB* completos y los alelos reordenados de forma incompleta en la agrupación D β -J β 2 de *TCRB* se observan con más frecuencia en LLA-T TCR $\alpha\beta$ ⁺ en comparación con LLA-T CD3⁻ y LLA-T TCR $\gamma\delta$ ⁺.²⁸ En el grupo total de LLA-T, la región D β -J β 1 de *TCRB* está implicada con relativa frecuencia en los reordenamientos en contraste con los otros reordenamientos del gen *TCRB* entre linajes en LLA-precursores B que implican exclusivamente la región D β -J β 2 de *TCRB*.^{30, 73}

El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra la mayoría de los dominios V β ha ayudado a identificar las expansiones de la familia V β .¹³ Sin embargo, el análisis de los reordenamientos de los genes de TCR es esencial para el estudio de la clonalidad en los trastornos linfoproliferativos de las células T. Ya que el repertorio codificado por la línea germinal restringido de los loci de *TCRG* y *TCRD* facilita las aproximaciones de PCR basadas en ADN, se han establecido diversos métodos de PCR para la detección de los reordenamientos de los genes *TCRG* y *TCRD*.⁹⁷⁻⁹⁹ No obstante, la diversidad de unión limitada de los reordenamientos *TCRG* conduce a una amplificación de fondo elevada de reordenamientos similares en células T normales (Ejemplo 6). El gen *TCRD*, por otra parte, está delecionado en la mayoría de las neoplasias malignas de células T maduras.²¹ Por lo tanto, son necesarias las técnicas de PCR de *TCRB* basadas en ADN para el estudio de la clonalidad. Además, los reordenamientos de *TCRB* son de gran interés para los estudios de seguimiento de los trastornos linfoproliferativos, debido a que el extenso repertorio combinatorio de los reordenamientos de *TCRB* y la gran región hipervariable permiten una detección muy específica de células tumorales residuales clínicamente ocultas. Sin embargo, el extenso repertorio codificado por la línea germinal hace más difíciles los ensayos de PCR. Algunas aproximaciones de PCR publicadas usan el procedimiento costoso en tiempo de aproximaciones con múltiples tubos con un panel de cebadores específicos de familia o de subfamilia.^{96, 100} El uso de cebadores consenso muy degenerados limita el número de reordenamientos detectables que están cubiertos en teoría por los cebadores, debido a que no hay una única secuencia común de suficiente identidad para permitir una amplificación fiable de todos los reordenamientos posibles.^{42, 101, 102} Ciertos ensayos publicados usan una PCR anidada que requiere una reacción de PCR adicional.^{42, 102} Otros ensayos se centran en el análisis de los transcritos V β -D β -J β -C β de *TCRB* para limitar el número de cebadores necesarios.^{16, 100, 103} Sin embargo, un inconveniente importante de estas aproximaciones basadas en mRNA es la necesidad de material reciente o congelado y una etapa de transcripción inversa antes de la amplificación mediante PCR.

Se intentó superar estas limitaciones creando una PCR de *TCRB* basada en ADN completamente nueva y práctica. Se diseñaron múltiples cebadores V β y J β , que cubrían todos los segmentos génicos V β y J β funcionales y que eran adecuados para la combinación en reacciones de PCR multiplex. Además, el ensayo es aplicable al análisis HD y al análisis GS, y también detecta los reordenamientos D β -J β de *TCRB* incompletos con el mismo grupo de cebadores J β . Para evitar problemas debido al cebado cruzado, se decidió diseñar todos los cebadores V β y J β en la misma región conservada de cada segmento génico.

Diseño de cebadores

Inicialmente, se diseñó un total de 23 cebadores V β , 2 D β (D β 1 y D β 2) y 13 J β (J β 1.1 a 1.6 y J β 2.1 a 2.7) con todos los cebadores V β y J β posicionados en la misma región conservada de cada segmento génico V β y J β , de forma que se pudieron omitir los efectos de la renaturalización cruzada en una reacción multiplex. Además, no se confundirían los reordenamientos V-J de *TCRB* policlonales poco frecuentes con un reordenamiento clonal incluso si no produjeran un patrón de picos Gaussianos completamente policlonal, porque los productos de PCR de todos los reordenamientos posibles están situados en el mismo intervalo de tamaños.

Para el diseño de los cebadores, cuando fue posible se tuvieron en cuenta los pseudogenes reordenables o los genes con marcos de lectura abiertos con alteraciones en los sitios de corte y empalme, las señales de recombinación y/o los elementos reguladores o los cambios de aminoácidos conservados. Sin embargo, el objetivo principal fue cubrir todos los genes V β funcionales. La eficacia de cebado de cada cebador V β se comprobó para cada gen V β mediante el uso del programa informático OLIGO 6.2. Esto condujo a cebadores que no fueron estrictamente específicos de la familia V β , y algunos de los cuales cubrieron los segmentos génicos V β de más de una familia (Figura 7B). Debido a que los 13 cebadores J β renaturalizaron con el mismo segmento de cada cebador del gen J β , la dimerización hizo necesario dividir los cebadores J en dos tubos. Inicialmente, se planeó usar los cebadores en cuatro grupos de reacciones multiplex de la siguiente manera: los 23 cebadores V β en combinación con los seis cebadores de la familia J β 1 (240-285 pb), los 23 cebadores V β con los siete cebadores de la familia J β 2 (240-285 pb), D β 1 (280-320 pb) con los seis cebadores J β 1, y D β 1 (280-320 pb) más D β 2 (170-210 pb) con los siete cebadores de la familia J β 2.

Resultados de la fase de análisis inicial

El análisis monoplex inicial de cada combinación de cebadores posible se llevó a cabo mediante el uso de muestras con reordenamientos de *TCRB* monoclonales conocidos y controles policlonales. Se generaron productos de PCR en el intervalo de tamaños esperado con diferencias en la intensidad de los productos, y el perfil de señales para las muestras policlonales dependió de la frecuencia de uso de los distintos segmentos génicos V β y J β . Sin embargo, cuando los cebadores se combinaron en una reacción multiplex, ciertos reordenamientos de J β 2 en particular se perdieron y se observaron productos inespecíficos en los tubos B y D. Además, la renaturalización cruzada entre los cebadores J β 1 y J β 2 dio como resultado problemas de interpretación. Como consecuencia, los cebadores J β 2 tuvieron que ser rediseñados y se tuvieron que reordenar las combinaciones de cebadores en diferentes tubos: los cebadores J β J β 2.2, 2.6 y 2.7 se modificaron ligeramente y se añadieron al tubo A. La localización de los cebadores J β 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5 se desplazó 4 pb en dirección 3' para evitar la dimerización de los cebadores y el cebado cruzado con los cebadores J β restantes. Solamente las bandas inespecíficas con una intensidad variable fuera del intervalo de tamaños esperado persistieron en el tubo B (bandas <150 pb, 221 pb) y en el tubo C (128 pb, 337 pb) mediante el uso de ADN molde específico. Sin embargo, debido a que todos los productos de amplificación inespecíficos estuvieron fuera de los intervalos de tamaño de los productos específicos de *TCRB*, no afectaron a la interpretación, y no se consideraron un problema. Sin embargo, mediante el uso de los controles inespecíficos del molde, fue visible un pico adicional inespecífico de 273 pb en el tubo A mediante el análisis GS. Este producto se inhibe completamente cuando el ADN contiene suficientes reordenamientos de *TCRB* clonales o policlonales, pero puede aparecer en las muestras que comprenden un número bajo de células linfoides. En la fase de análisis inicial, se generaron productos de PCR de V-D-J relativamente débiles. Así, se optimizaron las condiciones de PCR para los reordenamientos V-D-J completos incrementando la concentración de MgCl₂ y la cantidad de Taq polimerasa. Además, el uso de cebadores sumamente purificados y la aplicación del tampón ABI II en vez del tampón ABI Gold resultó ser muy importante. Para la detección de los reordenamientos D β -J β incompletos, fue posible finalmente mezclar todos los cebadores J β en un tubo sin pérdida de sensibilidad o de información. Por lo tanto, el número total de reacciones multiplex se pudo reducir a tres tubos.

El grupo de cebadores aprobado finalmente es (Figura 7B):

tubo A: 23 cebadores V β y 9 cebadores J β : J β 1.1-1.6, 2.2, 2.6 y 2.7

tubo B: 23 cebadores V β y 4 cebadores J β : J β 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5

tubo C: D β 1, D β 2 y los 13 cebadores J β .

Ya que los tubos A y C contienen los cebadores J β 1 y J β 2, el marcaje diferencial de los cebadores J β 1 y J β 2 con colorantes diferentes (TET para los cebadores J β 1.1-1.6 y FAM para los cebadores J β 2.1-2.7) permite la distinción mediante GS del uso de J β 1 o J β 2 en las reacciones de los tubos A y C (véase la Figura 13A).

- 5 El análisis de la sensibilidad se llevó a cabo por medio de experimentos de dilución con diversas líneas celulares y muestras de pacientes con genes *TCRB* reordenados clonalmente en MNC. Los experimentos de dilución con PCR simple alcanzaron generalmente niveles de sensibilidad de al menos el 0,1% al 1%. Tal como se esperaba, la sensibilidad disminuyó en los análisis multiplex, probablemente debido a un incremento de la amplificación de fondo. Especialmente en el análisis GS, este fondo dificultó la interpretación debido a la variación de longitudes relativamente pequeña de los productos de PCR de *TCRB*. No obstante, en 40 de los 46 controles positivos analizados se alcanzó una sensibilidad de al menos el 1% al 10% mediante el uso de heterodúplex o análisis GeneScan (Tabla 6).

Resultados de la fase de análisis general

- 15 Once grupos participaron en el análisis del ADN de una serie de 90 trastornos linfoproliferativos malignos y reactivos definidos mediante transferencia de Southern mediante el uso del protocolo multiplex de *TCRB*. Cada muestra se analizó mediante HD en dos laboratorios, y en seis laboratorios mediante el uso del análisis GS. Otros tres laboratorios usaron ambas técnicas para el análisis de PCR (Figuras 7C, D, y E). Esta fase de análisis, así como la experiencia del uso de estos ensayos de PCR *TCRB* generaron ciertos problemas generales sobre el protocolo que ya se describieron en parte en la fase de análisis inicial: 1. La variación de la longitud limitada de los productos de PCR de *TCRB* puede dificultar la detección mediante GS de las señales clonales en un fondo policlonal. 2. Solamente las bandas/picos dentro del intervalo de tamaños esperado representan reordenamientos del gen *TCRB* clonales. Especialmente para el tubo A, se debe incluir un ADN de control inespecífico para definir el pico de 273 pb específico que se puede dar en situaciones sin competición. 3. Es extremadamente importante usar cebadores sumamente purificados y tampón ABI II (y no tampón ABI Gold) para obtener buenos resultados de PCR, así como el protocolo de preparación de productos de PCR recomendado para el análisis HD. De los 90 casos definidos mediante transferencia de Southern presentados, 29 fueron SB positivos para los reordenamientos de *TCRB* monoclonales. 25 de estos reordenamientos clonales (86%) fueron detectables también mediante la PCR de *TCRB*. 23 reordenamientos fueron revelados mediante análisis GS y análisis HD, dos casos adicionales solamente mediante HD. Uno de los casos GS negativo y HD positivo (FR-9) fue interpretado como monoclonal en el análisis GS por cuatro de los nueve laboratorios implicados en la fase de análisis general (Figura 7C). Sin embargo, debido a un fondo policlonal significativo, la interpretación de los patrones de GS fue difícil en este caso particular. El otro caso GS negativo y HD positivo exhibió un producto de PCR atípico en el tubo C con un tamaño de alrededor de 400 pb (Figura 7E). El producto de PCR fue claramente visible en los geles de agarosa y el análisis HD, pero no mediante GS. Tras la secuenciación del ADN de este fragmento, se identificó un producto de amplificación D β 1-D β 2 de *TCRB* que explicaba el producto de PCR sin marcar. Cuatro casos positivos por SB (NL-15, NL-16, GBN-2 y FR-6) tampoco fueron detectados mediante GS ni mediante el análisis HD, y todos ellos tenían una neoplasia maligna linfóide B subyacente. Las explicaciones posibles para este fallo son los reordenamientos atípicos (p.ej. reordenamientos V β -D β incompletos),^{28, 104} las variaciones de secuencias de los segmentos génicos V β reordenados⁵¹ o la carencia de sensibilidad para reordenamientos particulares.

- Se consideró que 62 de las muestras eran policlonales mediante SB. Para 61 (98%) de estos casos los resultados de PCR fueron concordantes con al menos un método de análisis, para 57 (92%) casos los resultados fueron concordantes mediante el uso de ambos métodos. La muestra negativa mediante SB (ES-14) que se descubrió que era monoclonal mediante el análisis HD y el análisis GS mostró un reordenamiento D β 2 incompleto. Se obtuvieron resultados que no eran uniformes para cuatro muestras: se consideró que una muestra era clonal mediante GS, pero solamente por el 50% de los laboratorios que analizaron los productos de PCR mediante HD (GBS-4). Se descubrió que tres muestras producían señales clonales débiles solamente mediante el análisis HD (ES-6, GBS-9 y DE-2). Los subclones reordenados de *TCRB* que son demasiado pequeños para ser detectados mediante el análisis SB se pueden observar solamente mediante la metodología de PCR más sensible. En las neoplasias malignas de células B, los reordenamientos detectados pueden representar también expansiones clonales u oligoclonales de las células T residuales.¹⁰⁵ En este caso, estos productos de PCR clonales débiles no se deberían considerar una prueba de un trastorno de células T clonal. Esto subraya la importancia de la interpretación de los resultados de PCR en el contexto de otros análisis diagnósticos y el cuadro clínico de los pacientes. El estudio de PCR óptimo de los reordenamientos de *TCRB* se obtiene mediante el uso combinado del análisis HD y análisis GS. La sensibilidad puede diferir entre los dos métodos de detección en función del tamaño de los productos de PCR clonales en comparación con la distribución de tamaños policlonales: por otra parte, el análisis HD dispersa el fondo policlonal de los productos clonales, y por otra parte los productos de PCR fuera del intervalo de tamaños principal permiten una detección mediante GS más sensible. Además, el riesgo de resultados positivos falsos se reduce con el uso combinado del

análisis HD y el análisis GS. Además, el análisis HD permite la detección de ciertos reordenamientos D β 1-D β 2 de *TCRB* atípicos adicionales que no se pueden detectar mediante el análisis GS del producto de PCR ya que no hay implicado un cebador marcado en la amplificación. Sin embargo, el análisis GS es en general el método más informativo para las muestras con una carga tumoral elevada, debido a que se indica el tamaño exacto del producto de PCR monoclonal, que se puede usar con fines de monitorización, y los cebadores J β marcados de manera diferencial proporcionan información adicional sobre el uso del gen J β .

Conclusión

En conclusión, el sistema de PCR multiplex de *TCRB* de tres tubos proporciona un ensayo nuevo y práctico para el estudio de la clonalidad en proliferaciones de células T sospechosas con una tasa de detección de la clonalidad inéditamente elevada.

EJEMPLO 6: Reordenamientos del gen *TCRG*

Antecedentes

Los reordenamientos del gen *TCRG* se han usado durante mucho tiempo para la detección mediante PCR de ADN de la clonalidad linfóide, y representan el "prototipo" de objetivos con un repertorio restringido. Es un objetivo preferente para los análisis de clonalidad, ya que se reordena en una etapa temprana del desarrollo linfóide T, probablemente justo después de *TCRD*,¹⁰⁶ en los precursores de linaje TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$. Se reordena en más del 90% de LLA-T, LGL-T y LPL-T, en el 50-75% de LNH-T periférico y micosis fungoide, pero no en las proliferaciones de células NK auténticas. También se reordena en una parte importante de las LLAs de linaje B, pero mucho menos en LNH-B.^{1, 30, 73} A diferencia de otros diversos loci de Ig/TCR, la estructura genómica completa se conoce desde hace muchos años. Contiene un número limitado de segmentos V γ y J γ . La amplificación de todas las combinaciones V γ -J γ importantes es posible con un número limitado de cuatro cebadores V γ y tres J γ .

El locus de *TCRG* humano en el cromosoma 7p14 contiene 14 segmentos V γ , de los cuales solamente en diez se ha demostrado que experimenten reordenamientos (Figura 8A). El repertorio de V γ expresado incluye solamente seis genes V γ (V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8 y V γ 9) pero también se da el reordenamiento con los segmentos ψ V γ 7, ψ V γ 10, $\gamma\psi$ V γ 11.^{107, 108} El reordenamiento de ψ V γ B (también conocido como V γ 12)¹⁰⁷ es tan excepcional que se usa raramente en las estrategias de PCR diagnósticas. Los segmentos V γ que se reordenan se pueden subdividir en aquellos que pertenecen a la familia V γ I (V γ I: V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, ψ V γ 7 y V γ 8; homología total >90% y la mayor entre V γ 2 y V γ 4 y entre V γ 3 y V γ 5) y las familias V γ 9, ψ V γ 10, ψ V γ 11 de miembro único. El locus de *TCRG* contiene cinco segmentos J γ : J γ 1.1 (J γ P1), J γ 1.2 (J γ P), J γ 1.3 (J γ 1), J γ 2.1 (J γ P2), J γ 2.3 (J γ 2), de los cuales J γ 1.3 y J γ 2.3 son sumamente homólogos, al igual que J γ 1.1 y J γ 2.1.¹⁰⁹

Aunque el repertorio de la línea germinal de *TCRG* restringido facilita la amplificación mediante PCR, la diversidad de unión limitada de los reordenamientos de *TCRG* complica la distinción entre los productos de PCR clonales y policlonales. El locus de *TCRG* no contiene segmentos D, y muestra adiciones de nucleótidos relativamente limitadas. La longitud de la unión V-J de *TCRG*, por lo tanto, varía en 20-30 pb, en comparación con aproximadamente 60 pb para *IGH* y *TCRD*. La capacidad de distinguir los reordenamientos de *TCRG* clonales de los policlonales depende de la complejidad del repertorio policlonal. En general, las poblaciones clonales menores que usan reordenamientos V γ -J γ frecuentes tales como V γ I-J γ 1.3/2.3 corren el riesgo de perderse entre el repertorio policlonal, mientras se detectarán combinaciones infrecuentes con una sensibilidad mayor. No obstante, los linfocitos T policlonales ocasionales que muestran reordenamientos V γ -J γ infrecuentes se pueden confundir con un reordenamiento clonal, debido a la ausencia de un fondo policlonal para ese tipo de reordenamiento. Una posible fuente adicional de resultados positivos falsos resulta de la presencia de linfocitos T que expresan TCR $\gamma\delta$ que muestran reordenamientos de *TCRG* "canónicos", que no muestran adiciones de nucleótidos en N. El reordenamiento de *TCRG* canónico humano reconocido más habitualmente implica los segmentos V γ 9-J γ 1.2 y se da en aproximadamente un 1% de los linfocitos T de la sangre.^{110, 111} Es, por lo tanto, extremadamente importante analizar los productos de PCR de *TCRG* mediante el uso de técnicas electroforéticas de alta resolución o separar los productos de PCR basándose en criterios distintos del tamaño puramente, para reducir el riesgo de resultados positivos falsos. También es importante ser consciente del perfil de los reordenamientos canónicos y de las situaciones en las que se dan más habitualmente. Los reordenamientos V γ 9-J γ 1.2 canónicos, por ejemplo, se hallan de forma predominante en la sangre periférica, y se incrementan en frecuencia con la edad, ya que resultan de la acumulación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$.¹⁹

A diferencia de *TCRD*, *TCRG* no está delecionado en las células del linaje TCR $\alpha\beta$. Debido a que los reordenamientos de *TCRG* se dan en los precursores de los linajes TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, no se puede usar su identificación para la determinación del tipo de linaje de las células T. De forma similar, los reordenamientos de *TCRG* se dan en el 60% de las LLAs de linaje B,³⁰ lo que implica que no se pueden usar para el estudio del linaje de células B frente al linaje de células T en las proliferaciones inmaduras.

Sin embargo, se dan con mucha menor frecuencia en los trastornos linfoproliferativos B maduros, que incluyen la mayoría de LNH-B,¹ y se podrían usar, por lo tanto, en combinación con los datos clínicos e inmunofenotípicos para determinar la implicación del linaje en los trastornos linfoproliferativos maduros.

5 El repertorio limitado de la línea germinal permite la determinación de la utilización de los segmentos V γ y J γ , mediante transferencia de Southern o análisis de PCR. La identificación del uso de V γ y J γ no tiene un interés puramente académico, ya que la amplificación específica es necesaria para el análisis de la ERM.¹¹²

10 Se emprendió el desarrollo de un número mínimo de estrategias de *TCRG* multiplex que mantendrían una sensibilidad y una informatividad óptimas, minimizarían el riesgo de resultados positivos falsos y permitirían la identificación de V γ y J γ simple, que incluye el análisis HD o las estrategias de GS monofluorescente. Se eligió incluir cebadores V γ que detectaban todos los segmentos que se reordenaban distintos de ψ V γ B (ψ V γ 12), dada su baja frecuencia. Para reducir el riesgo de identificar en falso reordenamientos canónicos como productos clonales, se excluyó el cebador J γ 1.2, ya que raramente está implicado en las neoplasias linfoides y está asociado normalmente, aunque no siempre, a un reordenamiento de *TCRG* en el otro alelo.¹¹³

Diseño de cebadores

20 Inicialmente se desarrollaron 3 cebadores V γ y 2 J γ , para usarlos en dos reacciones multiplex, como sigue: un tubo con J γ 1.3/2.3 con V γ 9 específico (160-190 pb), V γ fl consenso (200-230 pb) y V γ 10/11 consenso (220-250 pb) y un segundo tubo con J γ 1.1/2.1 con V γ 9 específico (190-220 pb), V γ fl consenso (230-260 pb) y V γ 10/11 consenso (250-280 pb). El uso de V γ se iba a identificar por el tamaño de los productos de PCR mediante análisis HD. No se intentó una distinción entre J γ 1.3 y J γ 2.3 o J γ 1.1 y J γ 2.1.

Resultados de la fase de análisis inicial

25 Aunque todas las combinaciones V γ -J γ proporcionaron los perfiles esperados en una amplificación de PCR simple, la amplificación multiplex condujo a la competición de productos de PCR mayores, con la amplificación preferente de fragmentos más pequeños, y el fracaso para detectar ciertos reordenamientos V γ fl y V γ 10/11. Esto se complicó adicionalmente por la formación significativa de dímeros de cebadores entre los cebadores V γ 10/11 consenso y los cebadores V γ fl. La competición entre los fragmentos de diferentes tamaños y la formación de dímeros de los cebadores condujo a una sensibilidad e informatividad insatisfactorias, y por lo tanto se abandonó esta estrategia.

30 Se razonó que la competición se minimizaría separando los cebadores V γ usados más habitualmente (V γ fl y V γ 9) y combinándolos con cebadores específicos V γ 10 y V γ 11, respectivamente. Estos últimos reordenamientos se usan de manera infrecuente, y por lo tanto minimizan la competición por los repertorios predominantes. El cebador consenso V γ 10/11 se sustituyó, por lo tanto, por dos cebadores V γ específicos que generaron productos de PCR más pequeños (Figura 8B). Mezclando J γ 1.3/2.3 y J γ 1.1/2.1 fue posible mantener un multiplex de dos tubos que permite la identificación aproximada basándose en el tamaño de los productos del uso de V γ mediante análisis HD y del uso de J γ y V γ mediante análisis GS.

40 El grupo aprobado de tubos de PCR de *TCRG* multiplex con cuatro cebadores V γ y dos cebadores J γ incluye (Figura 8B):

Tubo A: V γ fl + V γ 10 + J γ 1.1/2.1 + J γ 1.3/2.3

Tubo B: V γ 9 + V γ 11 + J γ 1.1/2.1 + J γ 1.3/2.3

45 La posición y la secuencia de los cebadores se muestra en la Figura 8B. Estos cebadores proporcionaron una amplificación satisfactoria en los formatos de PCR simple y multiplex, y permitieron la detección de prácticamente todas las combinaciones V γ -J γ conocidas. No se observó más la competición de fragmentos de PCR mayores, aunque no se puede excluir que se pueda dar cierta competición de reordenamientos de V γ 9 o V γ fl si éstos están presentes en una población minoritaria.

50 La sensibilidad de la detección varió entre el 1% y el 10%, en función de la complejidad del repertorio policlonal y de la posición del reordenamiento clonal respecto del pico Gaussiano policlonal.¹¹⁴ La interpretación de los reordenamientos de ψ V γ 11 puede ser difícil, ya que el repertorio normal está extremadamente limitado, y ya que estos reordenamientos primitivos están presentes a menudo en los subclones.

55 Debido a que el segmento V γ 4 es aproximadamente 40 pb más largo que los otros miembros de V γ fl y que los reordenamientos de V γ 4 son relativamente habituales en las células linfoides tanto fisiológicas como patológicas, el repertorio policlonal puede estar sesgado hacia fragmentos de tamaños mayores, y los reordenamientos V γ 4-J γ 1.3/2.3 clonales se podrían confundir teóricamente con los reordenamientos V γ fl-J γ 1.1/2.1. La proximidad de los diferentes repertorios hace también la identificación de V γ y J γ mucho más fiable si se usan cebadores J γ marcados de forma diferencial. Por ejemplo, se

analizó el uso de un Jy1.1/2.1 marcado con TET y un Jy1.3/2.3 marcado con FAM en un único centro, y se demostró que proporcionaba resultados satisfactorios (Figura 13B). Es posible, sin embargo, estimar el uso de Vy y Jy tras el análisis GS basándose solamente en el tamaño (Figuras 8C y D).

Resultados de la fase de análisis general

5 Dado el repertorio de *TCRG* de la línea germinal limitado y la diversidad de unión limitada, los linfocitos T reactivos que han experimentado reordenamientos de *TCRG* mediante el uso de un único segmento Vy y Jy con las secuencias CDR3 variables que tienen una longitud uniforme, migrarán en forma de una población aparentemente clonal mediante análisis GS. La formación de HD dispersará estos reordenamientos más fácilmente, y por lo tanto evitará su interpretación errónea como prueba de la clonalidad linfoide. En contraste, el análisis GS proporciona una resolución y sensibilidad mejoradas en comparación con el análisis HD. Por estas razones, el estudio óptimo de los reordenamientos de *TCRG* requiere tanto el análisis HD como el análisis GS. Si esto no es posible, probablemente es preferible el análisis HD solamente, ya que podría estar asociado a un riesgo de resultados negativos falsos, mientras el análisis GS solo incrementará los resultados positivos falsos.

15 De los 18 reordenamientos de *TCRG* detectados mediante transferencia de Southern en los 90 casos, 16 se detectaron también mediante PCR. El reordenamiento Vyfl-Jy1.3/2.3 menor detectado mediante transferencia de Southern en la clase oligoclonal de NL-1 se detectó solamente mediante PCR en una proporción de laboratorios que realizaban el análisis GS. Se descubrió que un reordenamiento Vy9-Jy1.3/2.3 importante detectado en GBS-6 fue policlonal mediante HD y GS en todos los laboratorios y, como tal, probablemente representa un resultado negativo falso.

20 La comparación de la identificación de alelos demostró que, para todos los alelos identificados mediante transferencia de Southern, la identificación de Vy y Jy mediante PCR basándose en el tamaño proporcionó resultados concordantes. Se detectaron siete reordenamientos mediante transferencia de Southern, pero no fue posible la identificación precisa de los alelos. Seis de éstos se debieron al uso de Jy1.1/2.1, lo que sugiere que la PCR permite la detección preferente de este tipo de reordenamiento.

25 Se consideró que setenta y dos muestras eran policlonales mediante transferencia de Southern. Sesenta (22%) de éstas mostraron un total de 24 reordenamientos mediante PCR de *TCRG*. De éstas, 13 (81%) fueron proliferaciones linfoides B. Dieciséis de los 24 reordenamientos clonales fueron menores, y solamente 15 se detectaron mediante GS en la mayoría de los laboratorios. Merece la pena indicar que, de estos reordenamientos menores, nueve (39%) implicaron el segmento ψ Vy10 y ocho (33%) Vy9. No se detectaron reordenamientos de ψ Vy11. No se detectaron reordenamientos de ψ Vy10 mediante el análisis de transferencia de Southern. La PCR, por lo tanto, permitió una detección más sensible de los reordenamientos de ψ Vy10 clonales menores, en particular mediante el análisis GS. Es probable que estos reordenamientos representen linfocitos T de un linaje predominantemente TCR $\alpha\beta$, residuales, con un repertorio limitado, que pueden estar relacionados o no con la neoplasia maligna linfóide B subyacente. Estos picos menores no se deberían interpretar, obviamente, como una prueba de un trastorno de células T clonales. Acentúan la importancia de entender la naturaleza de los reordenamientos de *TCRG* antes de usar este locus como un objetivo de PCR en el ámbito del diagnóstico de la clonalidad linfóide. Por lo tanto, también es extremadamente importante interpretar los resultados del gen *TCRG* dentro de su contexto clínico.

Conclusión

45 En conclusión, los dos tubos multiplex de *TCRG* permiten la detección de la gran mayoría de reordenamientos de *TCRG* clonales. El riesgo potencial de resultados positivos falsos debido a la sobreinterpretación de picos clonales menores se puede minimizar mediante el uso combinado del análisis heterodúplex y el análisis GeneScan e interpretando los resultados dentro de su contexto clínico, en particular cuando la clonalidad aparente implica los segmentos ψ Vy10 y ψ Vy11. Se debería estudiar el mérito relativo del análisis de *TCRG* en comparación con el análisis de *TCRB* en el futuro para la detección de trastornos linfoproliferativos T clonales. Es probable que representen estrategias complementarias.

50 EJEMPLO 7. Reordenamientos del gen *TCRD*: V δ -D δ -J δ , D δ -D δ , V δ -D δ , y D δ -J δ

Antecedentes

55 El locus del gen *TCRD* humano está localizado en el cromosoma 14q11.2 entre los segmentos génicos Va y Ja. La parte principal del locus de *TCRD* (D δ -J δ -C δ) está flanqueada por elementos de delección de *TCRD*, ψ Ja y δ REC de forma que el reordenamiento de los elementos de delección entre sí o el reordenamiento de los segmentos génicos Va a Ja provoca la delección del locus del gen *TCRD* intermedio (Figura 9A). El locus de *TCRD* codificado por la línea germinal consiste en los segmentos génicos 8V δ , 4J δ , y 3D δ , de los cuales al menos cinco de los ocho segmentos génicos V δ se pueden reordenar también con los segmentos génicos Ja.¹¹⁵ También se pueden utilizar otros segmentos génicos Va en los reordenamientos del gen *TCRD* en casos poco frecuentes. La nomenclatura WHO-IUIS¹¹⁶ para

los segmentos génicos de TCR usa un sistema de numeración diferente para los genes V usados principalmente o exclusivamente en las cadenas TCR δ del que se puede usar en las cadenas TCR α o TCR β . Así, *TCRDV101S1* (V δ 1), *TCRDV102S1* (V δ 2) y *TCRDV103S1* (V δ 3) se usan casi exclusivamente en los reordenamientos de *TCRD*, mientras *TCRADV6S1* (V δ 4), *TCRADV21S1* (V δ 5) y *TCRADV17S1* (V δ 6) se pueden usar en las cadenas TCR δ o α . *TCRADV28S1* (V δ 7) y *TCRADV14S1* (V δ 8) se usan de manera muy poco frecuente en los reordenamientos de *TCRD*.

El repertorio codificado por la línea germinal de las células T TCR $\gamma\delta^+$ es pequeño en comparación con el de las células T TCR $\alpha\beta^+$, y el repertorio combinatorio es aún más limitado debido a la recombinación preferente en células T TCR $\gamma\delta^+$ de sangre periférica y timocitos. En el nacimiento, el repertorio de células T TCR $\gamma\delta^+$ de sangre de cordón es amplio, sin ninguna restricción aparente o expresión preferida de combinaciones V γ /V δ particulares. Durante la infancia, sin embargo, el repertorio de células T TCR $\gamma\delta^+$ de sangre periférica se perfila extraordinariamente de forma que las células V γ 9/V δ 2 predominan claramente en los adultos.¹¹⁷ Los estudios han demostrado que los repertorios V δ 1 y V δ 2 se limitan con la edad, lo que conduce a la aparición de células V δ 1⁺ y V δ 2⁺ oligoclonales en la sangre y el intestino.¹¹⁰ Las células T TCR $\gamma\delta^+$ están distribuidas de manera uniforme por todos los tejidos linfoides humanos, pero existe una expresión preferente de segmentos V δ particulares en las localizaciones anatómicas especificadas. De manera notable, la mayoría de células T TCR $\gamma\delta$ intraepiteliales que se dan en el intestino delgado y el colon expresan V δ 1. De manera similar, las células T TCR $\gamma\delta^+$ de bazo normal expresan V δ 1, pero las células T TCR $\gamma\delta^+$ de la piel expresan el gen V δ 2.

Aunque el pequeño número de segmentos génicos V, D y J disponibles para la recombinación limita la diversidad combinatoria potencial, la diversidad de CDR3 o de unión es extensa debido a la adición de las regiones N, las regiones P y la delección aleatoria de nucleótidos por las recombinasas. Esta diversidad se amplía también por la recombinación de hasta tres segmentos D δ , y por lo tanto hasta cuatro regiones N dentro del locus de *TCRD* reordenado. Esta diversidad de la línea germinal limitada codificada en el locus de *TCRD* junto con la diversidad de unión extensa da como resultado un objetivo útil para el análisis de PCR, y se han usado los sucesos de recombinación de *TCRD* exhaustivamente como marcadores clonales en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células T y B.^{119, 120} El locus de *TCRD* es el primero de todos los locus de TCR en reordenarse durante la ontogenia de las células T. El primer suceso es un reordenamiento D δ 2-D δ 3, seguido por un reordenamiento V δ 2-(D δ 1-D δ 2)-D δ 3, y finalmente un reordenamiento V δ -D β -J δ . Los reordenamientos inmaduros (V δ 2-D δ 3 o D δ 2-D δ 3) se dan en el 70% de LLA-precursores B (y por lo tanto no están limitados a un linaje)³⁰, a la vez que existe una predominancia de los reordenamientos maduros que comprenden los D δ 2-J δ 1 incompletos y V δ 1, V δ 2, V δ 3 a J δ 1 completos hallados en LLA-T.^{23, 121} Así, se pueden usar grupos de cebadores específicos para identificar los diferentes tipos de reordenamientos completos e incompletos que corresponden a los diferentes tipos de LLA.¹²²

Las LLA-T TCR $\gamma\delta^+$ forman un subgrupo relativamente pequeño de LLA, que representa un 10-15% de LLA-T pero que constituye todavía solamente un 2% de todas las LLA. Los reordenamientos V δ 1-J δ 1 predominan en LLA-T TCR $\gamma\delta^+$; de manera interesante, V δ 1 no se halla nunca en combinación con los segmentos J δ distintos de J δ 1.^{15, 20} Otras recombinaciones se dan en menos del 25% de los alelos. Además, las cadenas V δ 1-J δ 1-C δ están casi siempre unidas por puentes disulfuro a las familias génicas V γ 1 o V γ 11 recomendadas a J γ 2.3-C γ 2. Tal uso de los genes es coherente con el origen tímico inmaduro de estas células leucémicas.

La mayoría de linfomas de células T expresan TCR $\alpha\beta$, mientras la minoría expresa TCR $\gamma\delta$ y consiste en varias entidades diferentes. Los linfomas de células T periféricas (LCTP) que expresan TCR $\gamma\delta$ constituyen el 8-13% de todos los LCTP, y se han documentado recombinaciones V δ 1-J δ 1 así como otras recombinaciones V δ a J δ 1.^{123, 124} El linfoma de células T $\gamma\delta$ hepatoesplénico procede de las células T TCR $\gamma\delta$ esplénicas que expresan normalmente V δ 1. Es una entidad poco común que exhibe características clinicopatológicas distintivas, y el análisis del uso de genes ha indicado reordenamientos V δ 1-J δ 1 clonales asociados a estos linfomas.¹²⁵ Además, el tipo infrecuente de linfomas de células T TCR $\gamma\delta^+$ cutáneas expresa V δ 2, y por lo tanto parece representar una expansión clonal de células T TCR $\gamma\delta^+$ que residen normalmente en la piel.¹²⁶ Otras proliferaciones de TCR $\gamma\delta$ clonales incluyen las proliferaciones de linfocitos granulares grandes (LGL) CD3⁺ TCR $\gamma\delta^+$ que constituyen alrededor del 5% de todas las LGL CD3⁺ y a menudo muestran reordenamientos V δ 1-J δ 1.¹²⁷

El desarrollo de anticuerpos monoclonales hacia las regiones estructurales de TCR $\gamma\delta$ y más recientemente hacia segmentos génicos V δ específicos ha ayudado a identificar las poblaciones de células T TCR $\gamma\delta^+$ mediante análisis de citometría de flujo,¹⁵ pero todavía son necesarios estudios de clonalidad mediante PCR para identificar si estas poblaciones representan expansiones clonales o policlonales.¹²⁸

Diseño de cebadores

Los segmentos génicos de *TCRD*, que consisten en ocho segmentos génicos V δ , cuatro J δ y tres D δ , muestran poca o ninguna homología entre sí, y así se diseñaron cebadores específicos de segmento

que no mostrarían renaturalización cruzada con otros segmentos génicos. El uso de los segmentos génicos Vδ7 y Vδ8 se consideró demasiado infrecuente para justificar la inclusión de los cebadores de estos segmentos y así, siguiendo las directrices generales usadas en la invención para el diseño de cebadores, se diseñó un total de 16 cebadores: 6 Vδ, 4 Jδ y 5' y 3' de los 3 segmentos génicos Dδ (Figura 9B). Todos los cebadores se diseñaron para PCR multiplex juntos en cualquier combinación, pero en principio se planeó tener un tubo (A) con todos los cebadores V y todos los cebadores J que amplificarían todos los reordenamientos V(D)J completos y un segundo tubo (B) con cebadores Vδ2, Dδ2-5', Dδ3-3' y Jδ1 para amplificar los principales reordenamientos parciales (Vδ2-Dδ3, Dδ2-Dδ3 y Dδ2-Jδ1). En conjunto, estos tubos deberían amplificar el 95% de los reordenamientos conocidos. Los otros cebadores (Dδ1-5', Dδ3-5', Dδ1-3' y Dδ2-3') se podrían usar para amplificar otros reordenamientos Dδ-Jδ, Vδ-Dδ o Dδ-Dδ, pero siempre se pretendería que fueran opcionales.

Resultados de la fase de análisis inicial

Todas las combinaciones de pares de cebadores se analizaron mediante el uso de ADN policlonal (amígdala y MNC). La mayoría de ellas proporcionaron productos del tamaño esperado, pero algunas (Dδ1-5', Dδ1-3' y Dδ2-3') no proporcionaron un producto visible en combinación con cualquier otro cebador. Es probable que los reordenamientos que implican las regiones de estos cebadores sean extremadamente infrecuentes, así que éstos, y Dδ3-5', se excluyeron de los análisis posteriores. Se analizaron casos clonales en busca de los seis reordenamientos principales (Vδ1-Jδ1, Vδ2-Jδ1, Vδ3-Jδ1, Dδ2-Dδ3, Vδ2-Dδ3 y Dδ2-Jδ1) inicialmente en una PCR monoplex y después en los tubos A y B multiplex (véase anteriormente). Las diluciones en serie del ADN clonal en ADN policlonal (amígdala o MNC) mostraron sensibilidades de detección de al menos un 5% en todos los casos. Sin embargo, en los casos clonales con reordenamientos bialélicos, que se detectaron claramente en reacciones simples de PCR, el segundo alelo, normalmente mayor, no se pudo amplificar en condiciones multiplex. Además, se descubrió, mediante el uso de un grupo diferente de casos clonales, que no se pudieron amplificar varios de los reordenamientos Vδ2-Jδ1. Posteriormente se identificó un sitio polimórfico en la posición del cebador Vδ2 original;¹²⁹ la frecuencia de este polimorfismo en la población general es desconocida, y así se rediseñó este cebador hasta una región nueva del segmento génico Vδ2, se volvió a analizar y se descubrió que se amplificaba en todos los casos. El problema sobre la incapacidad de amplificar el segundo alelo se superó incrementando la concentración de MgCl₂ de 1,5 mM a 2,0 mM.

También se analizó la posibilidad de combinar los dos tubos en una única reacción multiplex. Se analizaron doce casos clonales, que tuvieron un total de 21 reordenamientos génicos entre ellos. Se usó un único tubo multiplex que contenía 12 cebadores (6 Vδ, 4 Jδ, Dδ2-5' y Dδ3-3') con tampón ABI Gold y MgCl₂ 2,0 mM para amplificar todos los casos. De hecho, se detectaron todos los reordenamientos génicos con una sensibilidad del 0,5-10% mediante análisis HD cuando se diluyeron en ADN de MNC policlonal (Tabla 7). El único problema con la combinación de todos los cebadores de *TCRD* en un único tubo fue la aparición de una banda inespecífica de alrededor de 90 pb en todas las amplificaciones, que no estuvo presente cuando se usaron los dos tubos multiplex por separado. Debido a que la banda estaba fuera del intervalo de tamaños de los productos de *TCRD* y no interfirió con la interpretación, no se consideró un problema.

Resultados de la fase de análisis general

El análisis de las 90 muestras definidas mediante transferencia de Southern en diez laboratorios generó ciertas cuestiones generales sobre el protocolo de *TCRD*:

La interpretación de ciertos resultados de GS fue difícil. Debido al gran intervalo de tamaños de los productos para el locus de *TCRD*, no hay una distribución Gaussiana clásica para las muestras policlonales (véase la Figura 9C) y esto, unido al uso bajo de *TCRD* en muchas muestras, significó que en ciertos casos fue difícil determinar si una muestra era policlonal o clonal. Este mismo problema no surgió con el análisis HD, y así la recomendación es que solamente se debería usar el análisis GS para *TCRD* con un gran cuidado y el conocimiento de los problemas potenciales.

La banda inespecífica de 90 pb fue bastante intensa en ciertos laboratorios, pero menor en otros. Pareció ser más débil cuando se usó el tampón II en vez del tampón Gold (confirmado por los análisis posteriores) y es también sensible a la concentración de MgCl₂, y se hace más intensa a medida que se incrementa la concentración de MgCl₂. Este producto se ha secuenciado y se ha descubierto que es un gen no relacionado mediante la utilización de los cebadores Dδ2 y Jδ3.

Los resultados del análisis general de las 90 muestras definidas mediante transferencia de Southern demostraron que la concordancia global de todos los grupos de PCR que realizaron el análisis fue muy elevada (95%). De los 90 casos, seis fueron positivos mediante transferencia de Southern para los reordenamientos clonales de *TCRD*, cinco de los cuales se descubrió que eran clonales mediante PCR. Todos los laboratorios descubrieron que el caso restante (DE-10, una LLA-T con una carga tumoral elevada) era policlonal. De los 84 casos negativos mediante transferencia de Southern, se descubrió que 75 eran policlonales mediante PCR, se descubrió que cuatro eran clonales y los cinco casos restantes

mostraron discordancias entre los resultados mediante GS y HD. De los casos clonales, dos (DE-2 y GBS-9) fueron LNH-Bs ricos en T con una carga tumoral presumiblemente baja, y así los resultados pueden reflejar la sensibilidad incrementada de la PCR sobre la transferencia de Southern. Los otros dos casos clonales (GBS-15 y ES-7) tuvieron una carga tumoral elevada. De los cinco casos, que mostraron discrepancias entre los resultados de GS y HD, uno (NL-1) fue un caso oligoclonal difícil, que causó problemas para otros diversos loci. Se descubrió que los cuatro restantes eran policlonales mediante HD y clonales mediante GS. En tres de los casos (NL-13, N-15 y NL-18) esto puede reflejar la sensibilidad mayor del análisis GS sobre el análisis HD, pero el caso restante (PT-1, un nódulo linfático reactivo) se puede atribuir a la "pseudoclonalidad" en el análisis GS debido al repertorio limitado del uso de *TCRD* en ciertas muestras.

Conclusión

En conclusión, el protocolo recomendado para la detección de los reordenamientos del gen *TCRD* es un ensayo de un único tubo que contiene 12 cebadores para la detección de los principales reordenamientos V δ (D)J δ , V δ -D δ , D δ -D δ y D δ -J δ mediante el uso de tampón II y MgCl₂ 2,0 mM para asegurar la máxima especificidad y detección. El método de análisis preferido es HD, pero se puede usar GS con cuidado si se tienen en cuenta los problemas de pseudoclonalidad provocados por el uso limitado de *TCRD* en ciertas muestras. Sin embargo, el uso del análisis GeneScan multi-color (véase la Figura 13C) puede ser útil en el reconocimiento rápido de los diferentes tipos de reordenamientos del gen *TCRD* completos e incompletos en los diferentes tipos de LLA. Con estas limitaciones en mente, *TCRD* puede ser, no obstante, un objetivo valioso para las leucemias de células T más inmaduras, así como para las proliferaciones de células T TCR $\gamma\delta$ ⁺.

EJEMPLO 8. t(11;14) con reordenamiento *BCL1-IGH*

Antecedentes

La t(11;14)(q13;q32) es característica del linfoma de las células del manto (LCM) debido a que esta translocación recíproca citogenética se ha observado en un 60-70% de casos de LCM y solamente de manera esporádica en otros LNH de células B.¹³⁰ La región de ruptura fue clonada originariamente por Tsujimoto et al (1983) y denominada región *BCL1*.¹³¹ Sin embargo, solamente en unos casos con una t(11;14) citogenética se identificó un punto de ruptura genómico en la región *BCL1*. Mediante el uso de FISH de fibras y en interfase con sondas que cubren la región 11q13-*BCL1* de aproximadamente 750 kb, en casi todas las LCM (33 de 34) se observó un punto de ruptura, y todos los puntos de ruptura estaban limitados en una región de 360 kb en 5' del gen de ciclina D1.^{132, 133} En casi la mitad de los casos de LCM (41%), los puntos de ruptura estuvieron agrupados dentro de una región de 85 pb que se denominó región de agrupamiento principal de translocaciones, *BCL1-MTC*.^{130, 134, 135} En la mayoría de los casos de LCM, si no en todos, la ruptura en el locus de *IGH* localizada en 14q32 implica los genes J_H que yuxtaponen el potenciador *IGH-E μ* en las secuencias del cromosoma 11q13 y por lo tanto dan como resultado la activación transcripcional del gen de ciclina D1.¹³⁸ La ciclina D1 junto con CDK4 fosforila (e inactiva) pRB y permite la progresión por la fase G1 del ciclo celular. Debido a que la ciclina D1 es silenciosa en los linfocitos B y en LNH de células B distinto de LCM, y la presencia de esta translocación se correlaciona bien con la expresión de ciclina D1, se considera que este gen es el objetivo biológico relevante en LCM.¹³⁸ La expresión de la ciclina D1 y/o la presencia de t(11;14)(q13;q32) se usa como una herramienta adicional en el diagnóstico diferencial de LNH.² La estrategia de detección de referencia para la presencia de t(11;14) que identificará casi todos los puntos de ruptura es la FISH en interfase mediante el uso de sondas flanqueantes del punto de ruptura en material reciente o congelado¹³³, así como en muestras archivadas.¹³⁷ Sin embargo, podría ser útil una estrategia de detección basada en PCR para t(11;14), p.ej., para la monitorización de la enfermedad residual. Muchos grupos han desarrollado ensayos basados en PCR para detectar los puntos de ruptura *BCL1/JH*, en general mediante el uso de un cebador JH consenso en combinación con cebadores de la región *BCL1-MTC* que estaban todos localizados en una región de 392 pb.^{54, 55} Las rupturas dentro de la región *BCL1-MTC* se pueden dar hasta 2 kb en dirección 3' de la región MTC, pero la mayoría de los puntos de ruptura están muy agrupados dentro de un segmento de 85 pb, inmediatamente en dirección 3' del cebador más en 3' informado ("cebador B" en ^{54, 134}). Debido a que las rupturas en esta región *BCL1-MTC* suponen solamente parte de los puntos de ruptura de la región 11q13-*BCL1* en los casos de LCM (41%), la estrategia basada en PCR para t(11;14) reduce seriamente la capacidad de diagnóstico con una tasa elevada de resultados negativos falsos en comparación con FISH.

Se ha informado también que t(11;14)(q13;q32) se observa en otras enfermedades proliferativas de células B tales como mieloma múltiple (20%), SLVL (30%), LPL-B (33%) y LLC-B (8%).^{130, 138, 139} Una razón para la presencia de t(11;14) en LLC-B en ciertos estudios podría ser debida a la clasificación incorrecta de LLC-B.¹³⁰ En el mieloma, los puntos de ruptura son bastante diferentes de los de LCM debido a que (i) la frecuencia es mucho menor; (ii) la mayoría de las rupturas implican sitios de recombinación de cambio de clase; y (iii) aunque todos los casos analizados están localizados en la misma región de *BCL1* de 360 kb, no parece haber un agrupamiento preferente dentro de la región *BCL1*-

MTC. Por otra parte, en todos los casos con una ruptura está activado el gen de ciclina D1. Es de destacar, en un subgrupo de mielomas múltiples con un myeov con ruptura modificada de *IGH*, que está implicada una región adicional en la región 11q13-*BCL1*.¹³⁸

Diseño de cebadores

5 Basándose en la localización del punto de ruptura más en 5' informado y las secuencias de nucleótidos disponibles de la región *BCL1*-MTC (número de acceso de GenBank S77049), se diseñó un único cebador *BCL1* (5'-GGATAAAGGCGAGGAGCATAA-3') en la región de 472 pb en 5' de este punto de ruptura mediante el uso del programa de diseño de cebadores OLIGO 6.2 respecto del cebador JH consenso.

10 Resultados de la fase de análisis inicial

Mediante el uso del cebador JH consenso en combinación con el cebador único *BCL1*-MTC en una pequeña serie de LCM (n=5) identificada previamente como positiva con una PCR de *BCL1*/JH interna mediante el uso de un cebador JH18 consenso (18 nt) similar y 5'-GCACTGTCTGGATGCACCGC-3' como cebador *BCL1*-MTC, se compararon inicialmente ambos ensayos en paralelo. En contraste con el análisis de los reordenamientos de los genes de Ig/TCR por medio del análisis GS y/o análisis HD, los productos de la PCR de *BCL1*-JH (como para los productos de *BCL2*-JH) se identifican por medio de una electroforesis en gel de agarosa usando solamente una tinción de bromuro de etidio. Los resultados de las cinco muestras positivas y las dos negativas fueron idénticos, excepto en que los productos de PCR fueron significativamente más débiles. Para determinar si se podría incrementar la sensibilidad de la PCR, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y cebadores, y diferentes temperaturas en un aparato de PCR Stratagene-Robocycler (todas las demás PCR se llevaron a cabo en ABI-480 o ABI-9700). Lo más intrigante fue la variación debida a pequeños cambios en la concentración de $MgCl_2$. A 2,0 mM se hizo evidente un producto inespecífico débil de 550 pb, mientras a 2,5 mM y más este producto inespecífico fue muy prominente en todos los ADN, lo que incluye los controles de ADN que no eran moldes. A concentraciones menores (menores de 1,5 mM) no se observaron fragmentos inespecíficos, pero los productos específicos esperados fueron muy débiles.

Las hibridaciones con una oligo-sonda interna de *BCL1*-MTC (5'-ACCGAATATGCAGTGCAGC-3') no mostraron hibridación con este producto de 550 pb. Las PCRs con cada uno de los cebadores por separado revelaron que el producto de 550 pb se podía generar mediante el uso del cebador consenso JH solamente. En ciertos casos de LCM, además de los productos de PCR que oscilaban en 150-350 pb (Figura 10B), podrían ser evidentes productos de PCR específicos mayores debido a la renaturalización del cebador JH consenso con segmentos JH5 y JH6 en posición 3' tal como se describió para *BCL2*/JH.¹⁴⁰ A partir de la fase de análisis inicial, las condiciones de PCR más óptimas para la PCR de *BCL1*-MTC/JH fueron: temperatura de renaturalización de 60 °C, $MgCl_2$ 2,0 mM y 10 pmol de cada cebador (para 35 ciclos de PCR en el ABI 9700).

Para determinar la especificidad de la PCR en una serie mayor de casos, se llevó a cabo la PCR de *BCL1*-MTC/JH en tres laboratorios con ADN de un total de 25 casos de LCM que se identificaron previamente como positivos mediante PCR de *BCL1*/JH interna, y de 18 controles negativos. Ninguno de los casos negativos reveló un producto de PCR, mientras 22 de 25 casos positivos mostraron productos del tamaño esperado. En los tres casos que no revelaron un producto en el gel de agarosa, se detectó un producto con GS, lo que sugiere que la sensibilidad es menor cuando se compara con la PCR interna.

La sensibilidad de la PCR se determinó amplificando diluciones de ADN de una LCM en ADN de amígdala normal. Se observó una sensibilidad de entre 10^{-3} y 10^{-4} en el gel de agarosa mediante el uso de los cebadores de PCR desarrollados. Una PCR interna llevada a cabo en paralelo con las mismas muestras fue al menos 10x más sensible. Las hibridaciones con la oligo-sonda de *BCL1*-MTC interna revelaron una sensibilidad 10-100x mayor de ambas PCRs. Se usan diluciones con ADN de una línea celular JVM2 establecida (disponible de DSMZ; <http://www.dsmz.de>) con un punto de ruptura *BCL1*-MTC/JH⁵³ como control positivo estándar. Como control negativo, se podría usar tejido de amígdala normal o células de sangre periférica, pero casi cualquier LNH de células B que no sea LCM debería ser adecuado debido a la frecuencia muy baja de esta anomalía.¹³⁰

Resultados de la fase de análisis general

Para estudiar las variaciones entre laboratorios para la detección de los puntos de ruptura en la región *BCL1*-MTC, diez grupos participaron en el análisis de ADN de una serie de 90 linfoproliferaciones malignas y reactivas definidas histológicamente mediante el uso del protocolo de PCR de *BCL1*-MTC/JH. Todos los casos se definieron por su estado en los loci de Ig y TCR mediante el uso de técnicas de hibridación de Southern. De los 90 casos, siete se caracterizaron histológicamente como LCM. Se demostró que los siete casos de LCM tenían un reordenamiento de *IGH* clonal mediante hibridación de Southern. La determinación de los reordenamientos dentro de la región de *BCL1*-MTC en el cromosoma 11q13 mediante hibridación de Southern o FISH no se llevó a cabo en todos los casos. En seis de los siete casos de LCM, el producto de PCR se identificó en los diez laboratorios. En el caso de LCM NL-15

en seis de los laboratorios se identificó el producto de PCR esperado de 1,8 kb. Este caso particular porta un punto de ruptura excepcional con un producto de PCR grande poco común (normalmente oscilan de 150 a 350 pb) y representa el punto de ruptura de *BCL1*-MTC detectable más lejano en dirección 3' conocido. En dos de los seis laboratorios, se observó el producto de PCR pero inicialmente se consideró inespecífico debido a su tamaño poco común. En ES-4, caracterizado histológicamente como LCM, no se pudo detectar en ninguno de los diez laboratorios un producto de PCR, lo que sugiere que este caso porta un punto de ruptura fuera de *BCL1*-MTC. Se debería subrayar que los casos de LCM presentados en esta serie para la fase de análisis general fueron seleccionados, y así se espera que porten rupturas en la región *BCL1*-MTC con una incidencia superior a la normal. De manera importante, excepto para un único caso (FR-1), en los demás 83 casos que no eran LCM, que incluían 16 casos que se caracterizaron histológicamente como LLC-B, no se detectó un producto de PCR de *BCL1*-MTC/JH en ningún laboratorio. En el caso FR-1, caracterizado histológicamente como LLC-B, en tres de los diez laboratorios se identificó un producto que indicaba que el número de células con esta ruptura era bajo. El estado de *IGH* determinado mediante un análisis de transferencia de Southern reveló que esta muestra estaba compuesta de un 90% de células B clonales, de acuerdo con el examen histológico. Los análisis de clonalidad de células B basados en PCR para *IGH* e *IGK* (sensibilidad de aproximadamente un 1%) revelaron un único clon, y el análisis de transferencia de Southern para *IGK* mostró solamente un único reordenamiento importante de *IGK*. Además, el análisis mediante transferencia de Northern de la expresión de ciclina D1 no mostró sobreexpresión. Todos estos datos indicaron que el número muy pequeño (menos del 1%) de células positivas para t(11;14) representan (i) un subclon derivado de LLC-B, (ii) una segunda neoplasia maligna B independiente o (iii) células B normales como las descritas para las células B positivas para t(14;18) en individuos normales.¹⁴⁰ sin embargo, con los datos disponibles de este paciente, actualmente no se puede distinguir entre estas tres alternativas. En resumen, el análisis de los diez laboratorios ilustra la elevada especificidad de la estrategia de PCR de *BCL1*-MTC/JH.

Para determinar la presencia de posibles casos negativos falsos debidos a la relativa baja sensibilidad de la PCR, en un laboratorio se llevó a cabo la PCR interna descrita previamente (con una sensibilidad alrededor de 10 veces mayor) con ADN de los 90 casos, y los productos de PCR de ambos ensayos se hibridaron también con una oligo-sonda de *BCL1*-MTC interna que incrementa la sensibilidad otras 10-100 veces. Este análisis no reveló productos de PCR en otros casos.

Conclusión

Se concluye que también la sensibilidad de la PCR de *BCL1*-MTC/JH (entre 10^{-3} y 10^{-4}) es lo suficientemente elevada para la detección del punto de ruptura de *BCL1*-MTC/JH en el material de diagnóstico. Los resultados de esta aproximación son muy alentadores, y sugieren que la definición de las aproximaciones comunes y de las condiciones de reacción pueden minimizar los resultados erróneos. No obstante, se debería recordar que se detectarán como máximo alrededor del 50% de los puntos de ruptura de t(11;14) en LCM, y que para el diagnóstico se recomiendan herramientas de detección adicionales.

EJEMPLO 9. t(14;18) con reordenamiento *BCL2*-*IGH*

Antecedentes

La t(14;18) es una de las anormalidades citogenéticas recurrentes mejor caracterizadas en la enfermedad linfoproliferativa de células B periféricas.¹⁴¹ Es detectable en hasta el 90% de los linfomas foliculares y el 20% de los linfomas de células B grandes, dependiendo del análisis de diagnóstico utilizado.¹⁴² Como consecuencia de la translocación, el gen *BCL2* de 18q32 se coloca bajo control de los potenciadores intensos del locus de *IGH*, lo que da como resultado la desregulación de su patrón de expresión normal.^{143, 144} *BCL2* está localizado en la membrana mitocondrial externa y su función normal es antagonizar la apoptosis, y cuando está desregulado está implicado íntimamente en la patogénesis del tumor.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Como consecuencia de este papel en la patogénesis, la t(14;18) proporciona un objetivo ideal tanto para el diagnóstico como para la monitorización molecular de la enfermedad residual.

El locus de *IGH* está localizado en 14q32.3 con las regiones V_H dispuestas en posición telomérica y las regiones D_H , J_H y constantes colocadas en posición más centromérica. La orientación de la transcripción es desde el telómero al centrómero con potenciadores localizados en 5' de las regiones V entre cada una de las regiones constantes. La forma más habitual de la translocación implica el proceso de recombinación VDJ, y una de las seis regiones J_H de la línea germinal está estrechamente opuesta a *BCL2*. La mayoría de las estrategias de detección basadas en PCR han utilizado un cebador J_H consenso que detectará la mayoría de las translocaciones.^{149, 150} En contraste con el locus de *IGH*, el patrón de las rupturas en *BCL2* es más complicado. *BCL2* está localizado en el cromosoma 18q21 y está orientado 5' a 3' desde el centrómero al telómero. La mayoría de los puntos de ruptura están dentro de la MBR de 150 pb localizada en la región sin traducir de 3' del exón 3.¹⁵¹ Como consecuencia de la translocación, el potenciador S_{μ} localizado en 3' de las regiones J_H se coloca en estrecha proximidad al gen *BCL2*, lo que conduce a su desregulación. A medida que se han investigado más translocaciones se ha hecho evidente que hay otras diversas regiones de puntos de ruptura que se deben tener en cuenta para una estrategia

de detección mediante PCR eficaz. Colocado a 4 kb en dirección 3' de la MBR hay otra región adicional de punto de ruptura, la subagrupación 3' MBR, que abarca una región de 3,8 kb.¹⁵² El mcr está localizado a 20 kb en 3' de la MBR y cubre una región de 500 pb.¹⁵³ Sin embargo, aunque análogo a MBR, el mcr es más extenso de lo que se previó inicialmente, y se ha descrito una región de 10 kb en dirección 5' del mcr, la subagrupación 5' mcr.^{154, 155} Además de estos puntos de ruptura clásicos, se han descrito varias translocaciones variantes en las que las rupturas ocurren en 5' de *BCL2*.¹⁵⁶ Estas son, sin embargo, poco frecuentes, y así no se pueden tener en cuenta al usar una estrategia de detección basada en PCR.

No existe una única estrategia de detección de referencia para la t(14;18), y en general se ha usado una combinación de métodos citogenéticos y transferencia de Southern.^{157, 158} Las estrategias de detección mediante FISH en interfase ofrecen una alternativa aplicable que tiene la posibilidad de hallar más translocaciones.¹⁵⁹ En contraste, el FISH de fibras basado en ADN ha sido muy informativo para la definición de translocaciones variantes, pero es inadecuado para la aplicación rutinaria.¹⁶⁰ Para los laboratorios de diagnóstico molecular las estrategias de detección basadas en PCR ofrecen resultados rápidos, generalmente son aplicables y se pueden usar para la monitorización de la enfermedad residual. Sin embargo, los cebadores usados habitualmente se han obtenido según las necesidades, y no se han diseñado para tener en cuenta la información reciente sobre la anatomía molecular de los puntos de ruptura. Como consecuencia, cuando se comparan con las aproximaciones de referencia, las técnicas basadas en PCR detectan solamente hasta un 60% de las translocaciones, lo cual reduce seriamente la capacidad de diagnóstico de la PCR. La composición de este porcentaje elevado de resultados negativos falsos es el problema de los resultados positivos falsos que surgen de la contaminación de otras muestras y de productos de PCR amplificados previamente.

Diseño de cebadores

Inicialmente se estudió un sistema multiplex de dos tubos, un tubo diseñado para detectar los puntos de ruptura dentro de la MBR y un segundo tubo usado para identificar los puntos de ruptura fuera de esta región. La estrategia de MBR contuvo tres cebadores MBR1, MBR2 y el cebador J_H consenso. La segunda reacción multiplex contuvo cinco cebadores, MCR1, MCR2, 5'mcr, 3' MBR1 y el JH consenso (Figura 11A), y se diseñó para detectar los puntos de ruptura dentro de las regiones mcr, 5'mcr y 3' MBR.

Resultados de la fase de análisis inicial

El estudio de estos cebadores se llevó a cabo en tres laboratorios con ADN procedente de un total de 124 casos de linfoma folicular que se sabe que portan una t(14; 18). 109 casos (88%) se identificaron con una fusión *BCL2-IGH*, 83/124 (67%) fueron positivos mediante el uso de MBR multiplex y 26/124 (21%) fueron positivos mediante el uso de la estrategia multiplex que no era de MBR. En 15/124 (12%) casos no hubo productos de PCR amplificables. El examen adicional de los casos identificados con la estrategia multiplex que no era de MBR demostró que 11 (9%) tenían un punto de ruptura dentro de mcr, cinco casos (4%) dentro de 5'mcr y 10/124 (8%) dentro de 3'MBR.

Para investigar adicionalmente el valor de este grupo de cebadores para la detección de los puntos de ruptura dentro de las regiones de sub-agrupaciones 5'mcr y 3'MBR se analizó una serie de 32 casos de linfomas foliculares positivos para t(14;18) que se sabía que eran de la línea germinal en la MBR y mcr mediante hibridación de Southern en un laboratorio. Cinco de los casos tuvieron puntos de ruptura dentro de 5'mcr (260-490 pb) y se amplificaron mediante el uso del cebador de 5'mcr aislado y con la reacción multiplex. Ninguno de los casos restantes mostró un resultado positivo. De la serie de 32 casos, ya se sabía que nueve tenían puntos de ruptura dentro de la región 3'MBR, y la aproximación multiplex fue capaz de detectar 5/9 de estos casos.

Para mejorar la sensibilidad del ensayo dentro de esta región se diseñaron tres cebadores adicionales que abarcaban la región de la sub-agrupación de 3'MBR; 3'MBR2, 3'MBR3 y 3'MBR4 y se combinaron con 3'MBR1 y el JH consenso en una reacción multiplex adicional; 3'MBR multiplex (Figura 11). Esta nueva aproximación confirmó que ocho de los 32 casos fueron positivos, pero no detectó el noveno caso. Los cebadores se usaron después de manera individual, y en este experimento 11 de los 32 casos fueron positivos. Los puntos de ruptura se distribuyeron como sigue; 2/11 casos tuvieron un punto de ruptura presente entre los cebadores 3'MBR1 y 3'MBR2, 3/11 casos entre los cebadores 3'MBR2 y 3'MBR3, 2/11 casos entre los cebadores 3'MBR3 y 3'MBR4, y los cuatro casos restantes se amplificaron mediante el uso del cebador 3'MBR4 y estuvieron distribuidos a 200-1000 pb en 3' de este cebador. En esta serie de casos hubo tres resultados negativos falsos mediante el uso del multiplex de 3'MBR. Uno de los casos fue un negativo falso auténtico en el que la ruptura ocurrió en mitad de 3'MBR, en la proximidad de una secuencia de repeticiones Alu. La translocación se detectó mediante el uso del cebador 3'MBR3 cuando se usó de manera aislada y se generó un producto de 450 pb, lo que sugiere una sensibilidad reducida del multiplex. Los dos casos negativos falsos restantes generaron productos mayores de 1000 pb con el cebador 3'MBR4, lo que les colocó en la 3'MBR lejana no cubierta completamente por esta aproximación. Se ha conseguido una mejora adicional de la sensibilidad del ensayo con 3'MBR siguiendo la fase de análisis general de este estudio. La sustitución del cebador 3'MBR3 con un nuevo cebador en 3'

5'-GGTGACAGAGCAAAACATGAACA-3' (véase la Figura 11A) mejoró significativamente tanto la sensibilidad como la especificidad del ensayo con 3'MBR.

- 5 Basándose en esto, la multiplex de 3'MBR se incorporó en la estrategia de diagnóstico. El análisis de los casos definidos mediante transferencia de Southern, por lo tanto, se llevó a cabo mediante el uso del sistema multiplex de tres tubos presentado en la Figura 11A.

Resultados de la fase de análisis general

- 10 Las variaciones entre los laboratorios están presentes de manera significativa en las estrategias de PCR de diagnóstico. Para estudiar esto, 11 grupos participaron en un ejercicio de control de calidad externo exhaustivo. Se extrajo ADN de una serie de 90 linfoproliferaciones malignas y reactivas definidas histológicamente y se analizaron mediante el uso del protocolo multiplex de t(14;18) (Figuras 11B, C, y D). Todos los casos se definieron por su estado en los loci de Ig y TCR mediante el uso de técnicas de hibridación de Southern. La confirmación cariotípica de la t(14;18) no estuvo disponible para esta serie. Por lo tanto, se adoptó una aproximación que requería una concordancia mayor del 70% entre los miembros de la red para la aceptación de la t(14;18). De los 90 casos, 11 se caracterizaron histológicamente como linfoma folicular. Se demostró que 11 casos tenían un reordenamiento de *IGH* clonal mediante hibridación de Southern. También se llevó a cabo el estudio de los reordenamientos dentro del gen *BCL2* mediante hibridación de Southern usando sondas específicas para MBR, mcr y 3'MBR en 10/11 casos. 4/10 casos mostraron un reordenamiento dentro de la MBR que fue coherente con el resultado de PCR. Un único caso, GBS-7, mostró ser positivo para multiplex de mcr, no proporcionó un resultado de SB concluyente con la sonda de mcr. Inmunofenotípicamente, este caso mostró dos poblaciones clonales diferentes, que representaban aproximadamente un 5% y un 15% del material de diagnóstico original. La discrepancia entre las dos técnicas en este caso representa probablemente la sensibilidad reducida de SB en comparación con PCR. No hubo pruebas de un reordenamiento de 3'MBR en ninguno de los casos restantes mediante SB.

- 25 De los seis casos de LCF negativos mediante SB, un único caso, ES-7, mostró una t(14;18) mediante el uso de multiplex de MBR. 5/11 casos de LCF no mostraron evidencia de una t(14;18) mediante SB o PCR. Se detectó una t(14;18) en dos casos adicionales mediante PCR; FR-6, un caso de LDCBG, mostró un punto de ruptura en MBR y fue identificado por los 11 laboratorios, y este hallazgo es compatible con los estudios previos que habían detectado una t(14; 18) en el 20-40% de los casos de LDCBG.^{161, 162} Mediante el uso del multiplex de 3'MBR, 10/11 laboratorios informaron de un resultado positivo para la muestra ES-12, que fue un caso de enfermedad de Hodgkin que contenía muy pocas células B. Es difícil explicar este resultado en ausencia de un reordenamiento de *IGH* mediante transferencia de Southern. La contaminación o el marcaje incorrecto de la muestra en la fuente es la explicación más probable.

- 35 Globalmente hubo una concordancia excelente en toda la red, aunque se encontró un pequeño número de resultados tanto positivos falsos como negativos falsos. En total, se identificaron 12 resultados positivos falsos, que representaban menos de un 0,4% (12/3036) del número total de análisis. Estos fueron informados por cinco laboratorios, e implicaron seis de las muestras. La mayoría de los positivos falsos (9/12) se hallaron en tres casos. Cinco resultados negativos falsos, que representaban una tasa de error del 6% (5/88), fueron informados por tres laboratorios, ES-7 no fue detectado por dos laboratorios, otros tres grupos de la red comentaron que este caso había mostrado señales de amplificación débiles con la multiplex de MBR. Los tres casos negativos falsos restantes fueron informados aisladamente por laboratorios individuales. Los resultados de los diagnósticos mediante el uso de esta aproximación son muy esperanzadores, y sugieren que la definición de las aproximaciones y condiciones comunes de reacción pueden minimizar los resultados erróneos.

Conclusión

- 50 En conclusión, se ha diseñado y estudiado una PCR multiplex sólida de tres tubos para maximizar la detección de la t(14;18). Esta estrategia es capaz de amplificar a través de la región del punto de ruptura en la mayoría de los casos de LCF con una translocación definida citogenéticamente. Aunque la sensibilidad de esta estrategia es menor que la de las aproximaciones de PCR simples o anidadas convencionales, todavía es perfectamente aceptable para los procedimientos de diagnóstico. La adopción extendida de los reactivos y las metodologías estándar ha ayudado a minimizar los resultados inexactos dentro de esta gran red multicéntrica. Sin embargo, es digno de mención a partir de la fase de análisis general de este estudio que es imposible detectar una t(14;18) en todos los casos. Esto se ve influido ciertamente por mecanismos moleculares adicionales capaces de desregular el gen *BCL2*.^{163, 164}

EJEMPLO 10: Uso de ADN extraído de biopsias de tejidos incrustados en parafina y desarrollo del grupo de cebadores de genes de control

Antecedentes

Se considera que el tejido reciente/congelado es el tipo de muestra ideal para la extracción de ADN para el uso en el análisis de la clonalidad basado en PCR. Sin embargo, el material reciente/congelado no está disponible siempre para los laboratorios de diagnóstico, y en muchos laboratorios de toda Europa las muestras de tejidos incrustados en parafina constituyen la mayoría de las biopsias para diagnóstico sometidas a análisis. El ADN extraído de este material incrustado en parafina es a menudo de baja calidad, y, así, es necesario estudiar los protocolos de PCR para el uso con este tipo de muestras antes de que se puedan usar de manera generalizada en los laboratorios de diagnóstico.

La integridad del ADN extraído de las muestras incrustadas en parafina y su amplificación mediante PCR se ven afectadas por varios factores tales como el grosor del tejido, el tipo de fijador, el tiempo de fijado, la duración del almacenamiento antes del análisis, los procedimientos de extracción de ADN y la co-extracción de inhibidores de PCR.¹⁶⁵⁻¹⁷² El fijador más usado habitualmente es la formalina tamponada neutra al diez por ciento (NBF al 10%), aunque los laboratorios también usan otros diversos fijadores, que incluyen la formalina sin tamponar y el fijador de Bouin. El uso de NBF al 10% permite la amplificación de fragmentos de ADN con un intervalo amplio de tamaños, mientras que el fijador de Bouin parece ser el menos adecuado para el uso en el análisis mediante PCR.^{167, 168, 171, 173} La integridad de los fragmentos del ADN extraído de las muestras incrustadas en parafina depende también del espacio de tiempo durante el cual se han almacenado los bloques, y los mejores resultados se obtienen normalmente a partir de bloques de menos de 2 años, mientras los bloques de más de 15 años tienden a producir fragmentos muy degradados.¹⁷⁴

20 Diseño de cebadores

Inicialmente, se diseñaron cinco pares de cebadores de PCR de genes de control para amplificar productos de exactamente 100, 200, 400, 600 y 1,000 pb para determinar la calidad del ADN sometido a análisis. Los genes objetivo se seleccionaron basándose en que tuvieran exones grandes con marcos de lectura abiertos para reducir el riesgo de seleccionar regiones polimórficas, y los cebadores se diseñaron para el uso multiplex en los protocolos estandarizados. Se seleccionaron los siguientes genes objetivo: gen de tromboxano sintasa humana (*TBXAS1*, Exón 9; número de acceso de GenBank D34621), gen activador de la recombinación humana (*RAG1*, Exón 2; número de acceso de GenBank M29474), gen de dedo de zinc de leucemia promielocítica humana (*PLZF*, Exón 1; número de acceso de GenBank AF060568), y gen AF4 humano (Exón 3; número de acceso de GenBank Z83679, y Exón 11; número de acceso de GenBank Z83687).

30 Resultados de la fase de análisis inicial

Los pares de cebadores se analizaron en reacciones por separado y posteriormente en reacciones múltiples mediante el uso de ADN de peso molecular elevado. Debido al gran intervalo de tamaños de los productos (100 a 1.000 pb), fue necesario variar la proporción de concentraciones de cebadores para obtener bandas de intensidades iguales en las reacciones multiplex. Sin embargo, se comprobó que era extremadamente difícil amplificar todas las bandas de manera reproducible, y se decidió que el producto de 1.000 pb era probablemente innecesario, ya que todos los protocolos de PCR según la invención proporcionan productos de menos de 600 pb. Por lo tanto, se decidió excluir el producto de 1.000 pb para mejorar la reproducibilidad del ensayo. Incrementando la concentración de $MgCl_2$ hasta 2 mM y añadiendo los cebadores en una proporción 1:1:1:2, fue posible amplificar de manera reproducible cuatro bandas (100, 200, 400 y 600 pb) de igual intensidad a partir de las muestras de ADN de peso molecular elevado. Sin embargo, para el ADN extraído a partir de bloques de parafina, se consideró que un marcador de tamaño extra a 300 pb sería muy informativo, y que el marcador de 600 pb podría ser innecesario. Mediante el uso de la secuencia génica para el marcador de 1.000 pb (*PLZF*), se rediseñaron los cebadores para generar un producto de 300 pb. Estos se analizaron con éxito tanto en reacciones monoplex como en reacciones multiplex combinando los cebadores de 100, 200, 300, 400 y 600 pb (véase la Figura 12A).

Así, están disponibles dos grupos de cebadores para determinar la calidad del ADN para la amplificación: Los cebadores de 100, 200, 300 y 400 pb usados a 2,5 pmol cada uno se pueden usar para estudiar el ADN de tejidos incrustados en parafina. La adición de los cebadores de 600 pb a 5 pmol permite que este grupo se use para comprobar la calidad de cualquier muestra de ADN para el uso con los cebadores y los protocolos descritos. Ambos grupos de cebadores se pueden usar con tampón ABI II y $MgCl_2$ 2,0 mM en condiciones de amplificación estandarizadas. Los productos se pueden analizar en una PAGE al 6% o agarosa al 2% (véase la Figura 12B).

55 Resultados de la fase de análisis general

Se recogieron cuarenta y cinco biopsias incrustadas en parafina que correspondían a 30 de las neoplasias malignas de células B, ocho de las neoplasias malignas de células T y siete de las linfoproliferaciones reactivas presentadas como muestras de tejido recientes/congeladas. La edad de los bloques de parafina, así como los métodos de fijación y de incrustación de las muestras, varió entre las redes nacionales. Las muestras ES se presentaron en forma de secciones pre-cortadas, NL-14, 15 y 16

se presentaron en forma de muestras de ADN y las biopsias restantes se presentaron en forma de bloques de parafina. Se cortaron cinco secciones (10 pm cada una) de los bloques de parafina, y se extrajo el ADN mediante el uso del equipo QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante para el aislamiento del ADN genómico a partir del tejido incrustado en parafina. Se eligió este método de extracción de ADN debido a que el equipo se puede usar para extraer rápidamente ADN de buena calidad de sangre, tejido reciente/congelado y tejido incrustado en parafina, y así permite el procesamiento en paralelo de una diversidad de tipos de muestras con un control de calidad asegurado. Se han publicado numerosos protocolos para la extracción de ADN a partir de tejido incrustado en parafina para el análisis mediante PCR.^{171, 172, 175-177} Muchos de éstos se dirigen a reducir la degradación del ADN y la co-extracción de inhibidores de PCR, pero muchos de estos métodos requieren procedimientos de extracción prolongados y pueden ser inadecuados para el uso en el laboratorio de diagnóstico rutinario.^{168, 178, 179}

Se estimó la concentración de la muestra de ADN y la integridad mediante espectrofotometría y mediante la comparación del ADN de la muestra con patrones conocidos en electroforesis en gel de agarosa. Después se analizó la integridad y la amplificabilidad de las muestras de ADN (100 ng) mediante el uso de los cebadores de PCR de genes de control (100-400 pb) y se estudió la clonalidad en todos los loci objetivo mediante el uso de los protocolos de PCR.

En la reacción de PCR de genes de control de 24/45 casos, los productos amplificados fueron de al menos 300 pb, mientras en las 21 muestras restantes los productos amplificados fueron de 200 pb o menos. No se pudo demostrar una correlación clara entre la calidad del ADN y la edad del bloque o el método de fijación. Por lo tanto, es probable que una combinación de factores sea responsable de la calidad del ADN en estas muestras.

Se estudió la clonalidad en las muestras de ADN mediante el uso de las 18 reacciones de PCR multiplex, y se analizaron mediante HD y GS. Se comparó el número de muestras de parafina que mostró clonalidad y translocaciones en los nueve loci objetivo con los datos de muestras recientes/congeladas correspondientes. En las muestras con productos de PCR de genes de control de hasta 200 pb, la detección global de la clonalidad en los nueve loci objetivo fue 9/55 (16%). De los 46 reordenamientos no detectados, 45 se pudieron explicar por el hecho de que los productos de PCR clonales esperados tuvieron un peso molecular superior que el tamaño máximo amplificado por la muestra en la PCR de genes de control. La muestra restante (PT-9) amplificó hasta 100 pb en la PCR de genes de control, pero no se detectó el producto clonal de *TCRG* esperado de 81 pb. En las muestras con productos de PCR de genes de control de al menos 300 pb, la detección total de la clonalidad en los nueve loci objetivo fue 42/55 (76%). De los 13 reordenamientos no detectados, cinco se pudieron explicar de nuevo por el hecho de que los productos de PCR clonales esperados fueron mayores que el tamaño máximo amplificado por la muestra en la PCR de genes de control. Los ocho reordenamientos no detectados restantes no se pudieron explicar directamente por la calidad del ADN. Se detectó un resultado clonal positivo falso (GBN-9; *IGL*) en un nódulo linfático reactivo, lo cual puede representar pseudoclonalidad.

Se sabe que hay presentes inhibidores de PCR en el ADN extraído a partir de muestras de parafina. La dilución de la muestra de ADN puede reducir la concentración de estos inhibidores hasta niveles que permiten que se dé una amplificación eficaz. Para investigar el efecto de la dilución de las muestras de ADN sobre la eficacia de la amplificación, se analizaron cuatro concentraciones diferentes de ADN en la reacción de PCR de genes de control: 5, 50, 100 y 500 ng. Se observó que la dilución de las muestras de ADN tiene un efecto significativo sobre el tamaño de los productos de PCR en la PCR de genes de control. En total, 24/45 casos (53%) mostraron una eficacia incrementada de la amplificación cuando se diluyeron de 100 ng a 50 ng. La concentración de ADN óptima parece estar entre 50 a 100 ng, mientras el uso de 500 ng parece inhibir la amplificación de productos grandes (300 pb o más). Aunque el uso de 5 ng de ADN proporciona resultados aceptables con la PCR de genes de control, esto puede conducir a resultados positivos falsos en ensayos de clonalidad basados en PCR debidos a la baja representación del ADN total de las células linfoides.^{160, 161} De manera más importante, 5 ng de ADN no tiene ninguna ventaja sobre una dilución a 50 ng de ADN.

Para determinar si el uso de 50 ng de ADN incrementaría también la detección de la clonalidad, se volvieron a analizar todas las muestras en el locus de V-J de *IGH* mediante el uso de esta concentración de ADN. El número de reordenamientos clonales detectados en los tres tubos V-J de *IGH* mediante el uso de 100 ng de ADN fue de 12, en comparación con 23 mediante el uso de las muestras recientes/congeladas correspondientes. La detección global de la clonalidad en este locus se incrementó hasta 17 de 23 cuando se usaron 50 ng de ADN, y se detectaron otros 9 productos clonales de FR1, 6 de FR2 y 4 de FR3. Así, la dilución del ADN puede incrementar la detección de los productos clonales, presumiblemente debido a la dilución de los inhibidores de PCR. Lógicamente, la dilución del ADN puede mejorar solamente los resultados de la PCR de genes de control y la detección de la clonalidad, si están presentes los inhibidores de PCR, no si la muestra de ADN está muy degradada. Por lo tanto, se recomienda que se analicen al menos dos diluciones de ADN mediante el uso de la PCR de genes de control, y que se use la dilución que proporciona mejor resultado en el análisis de la clonalidad posterior.

Nueve reordenamientos clonales permanecieron sin detectar tras el análisis inicial, lo cual no se pudo explicar por la calidad del ADN (*TCRG* en PT-9 y NL-11; *TCRB* en GBS-4; *TCRD* en NL-15; *IGK* en GBN-4, NL-4 y NL-5; V-J_H de *IGH* en GBS-6 y GBS-8). Estas muestras se volvieron a analizar mediante el uso de 50 ng de ADN, pero solamente una muestra (GBS8; *IGH*) mostró una detección mejorada, lo que sugiere que otros factores, desconocidos, pueden evitar la amplificación de objetivos específicos en un pequeño número de casos. Sin embargo, se debería indicar que para siete de estas muestras (NL-11, GBS-4, NL-15, GBN-4, NL-5, GBS-6 y GBS-8) se detectaron productos clonales en al menos un locus distinto. Esto demuestra que el análisis de la clonalidad en múltiples loci objetivo incrementa la probabilidad de detectar poblaciones de linfocitos clonales.

10 Conclusión

En conclusión, los protocolos proporcionados en la presente memoria funcionan bien con ADN extraído a partir de material incrustado en parafina, con tal de que el ADN pueda amplificar productos de 300 pb o más en la PCR de genes de control. Se analizan preferiblemente dos concentraciones de ADN en la PCR de genes de control, y se debería usar la concentración más "amplificable" en los análisis posteriores, aunque con la condición de que las concentraciones de ADN menores de 20 ng pueden contribuir a la detección de pseudoclonalidad debido a la baja representación del ADN linfóide objetivo.^{180, 181} Globalmente, los datos demuestran que la determinación de la calidad del ADN mediante el uso de la PCR de genes de control proporciona una buena indicación de lo adecuado que es el ADN para el análisis de la clonalidad mediante el uso de los protocolos proporcionados. También es importante indicar que la PCR de genes de control no dará ninguna indicación de la cantidad de ADN de células linfoides presente en la muestra, y por lo tanto el ADN de buena calidad todavía puede producir resultados negativos en el análisis de la clonalidad. Para asegurar que los resultados monoclonales son reproducibles (y para evitar una pseudoclonalidad potencial), todos los ensayos de clonalidad, en particular mediante el uso de ADN extraído de parafina, se llevan a cabo preferiblemente por duplicado, y se analizan mediante HD y GS, siempre que sea posible.

25 REFERENCIAS

1. Van Dongen JJM y Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. Clin Chim Acta 1991; 198: 93-174.
- 30 2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 2001, IARC Press: Lyon.
3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature 1983; 302: 575-581.
- 35 4. Davis MM y Björkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 1988; 334: 395-402.
5. Van Dongen JJM, Szczepanski T, Adriaansen HJ, Immunobiology of leukemia, en Leukemia, E.S. Henderson, T.A. Lister, y M.F. Greaves, Editores. 2002, WB Saunders Company: Philadelphia. pág. 85-129.
- 40 6. Szczepanski T, Pongers-Willems MJ, Langerak AW, van Dongen JJM. Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. Curr Top Microbiol Immunol 1999; 246: 205-215.
7. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. N Engl J Med 1999; 341: 1520-1529.
- 45 8. Smith BR, Weinberg DS, Robert NJ, Towle M, Luther E, Pinkus GS, Ault KA. Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1984; 311: 1476-1481.
9. Letwin BW, Wallace PK, Muirhead KA, Hensler GL, Kashatus WH, Horan PK. An improved clonal excess assay using flow cytometry and B-cell gating. Blood 1990; 75: 1178-1185.
10. Fukushima PI, Nguyen PK, O'Grady P, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. Cytometry 1996; 26: 243-252.
- 50 11. McCoy JP, Jr., Overton WR, Schroeder K, Blumstein L, Donaldson MH. Immunophenotypic analysis of the T cell receptor V beta repertoire in CD4+ and CD8+ lymphocytes from normal peripheral blood. Cytometry 1996; 26: 148-153.
12. Van Dongen JJM, van den Beemd MWM, Schellekens M, Wolvers-Tettero ILM, Langerak AW, Groeneveld K. Analysis of malignant T cells with the Vβ antibody panel. Immunologist 1996; 4: 37-40.
- 55

13. Van den Beemd MWM, Boor PPC, Van Lochem EG, Hop WCJ, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, Hooijkaas H, Van Dongen JJM. Flow cytometric analysis of the V β repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40: 336-345.
- 5 14. Lima M, Almeida J, Santos AH, dos Anjos Teixeira M, Alguero MC, Queiros ML, Balanzategui A, Justica B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A. Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alpha-beta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol* 2001; 159: 1861-1868.
- 10 15. Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, van den Beemd MWM, van Wering ER, Ludwig W-D, Hählen K, Necker A, van Dongen JJM. Immunophenotypic and immunogenotypic characteristics of TCRgd⁺ T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 206-214.
16. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero ILM, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, van Dongen JJM. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha-beta T-cell proliferations. *Blood* 2001; 98: 165-173.
- 15 17. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP, Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 1997; 89: 256-260.
- 20 18. Triebel F, Faure F, Graziani M, Jitsukawa S, Lefranc MP, Hercend T. A unique V-J-C-rearranged gene encodes a gamma protein expressed on the majority of CD3+ T cell receptor-alpha-beta-circulating lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 694-699.
19. Breit TM, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Unique selection determinant in polyclonal V delta 2-J delta 1 junctional regions of human peripheral gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1994; 152: 2860-2864.
- 25 20. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Hählen K, Van Wering ER, Van Dongen JJM. Limited combinatorial repertoire of gd T-cell receptors expressed by T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 1991; 5: 116-124.
21. Van Dongen JJM y Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; 198: 1-91.
- 30 22. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1993; 7: 2045-2053.
23. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Beishuizen A, Verhoeven M-AJ, van Wering ER, van Dongen JJM. Southern blot patterns, frequencies and junctional diversity of T-cell receptor d gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 3063-3074.
- 35 24. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, van Dongen JJM. Detection of immunoglobulin kappa light-chain gene rearrangement patterns by Southern blot analysis. *Leukemia* 1994; 8: 2228-2236.
25. Tümkaya T, Comans-Bitter WM, Verhoeven MA, van Dongen JJM. Southern blot detection of immunoglobulin lambda light chain gene rearrangements for clonality studies. *Leukemia* 1995; 9: 2127-2132.
- 40 26. Tümkaya T, Beishuizen A, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Identification of immunoglobulin lambda isotype gene rearrangements by Southern blot analysis. *Leukemia* 1996; 10: 1834-1839.
27. Moreau EJ, Langerak AW, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero ILM, Zhan M, Zhou Q, Koop BF, van Dongen JJM. Easy detection of all T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1999; 13: 1620-1626.
- 45 28. Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Detection of T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T cell malignancies by Southern blot analysis. *Leukemia* 1999; 13: 965-974.
29. Hara J, Benedict SH, Mak TW, Gelfand EW. T cell receptor alpha-chain gene rearrangements in B-precursor leukemia are in contrast to the findings in T cell acute lymphoblastic leukemia. Comparative study of T cell receptor gene rearrangement in childhood leukemia. *J Clin Invest* 1987; 80: 1770-1777.
- 50 30. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, van Wering ER, Wijkhuijs JM, Tibbe GJM, De Bruijn MAC, van Dongen JJM. Cross-lineage T-cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B-acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 196-205.
- 55

31. Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH. Lymphoma with multi-gene rearrangement on the level of immunoglobulin heavy chain, light chain, and T-cell receptor beta chain. *Am J Hematol* 1998; 59: 99-100.
- 5 32. Przybylski G, Oettle H, Ludwig WD, Siegert W, Schmidt CA. Molecular characterization of illegitimate TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 87: 301-307.
- 10 33. Boeckx N, Willemse MJ, Szczepanski T, van Der Velden VHJ, Langerak AW, Vandekerckhove P, van Dongen JJM. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 368-375.
34. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, Harts WA, Wijkhuijs JM, van Wering ER, van Dongen JJM. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor ab lineage. *Blood* 1999; 93: 4079-4085.
- 15 35. Kluin-Nelemans HC, Kester MG, van deCorput L, Boor PP, Landegent JE, van Dongen JJ, Willemze R, Falkenburg JH. Correction of abnormal T-cell receptor repertoire during interferon-alpha therapy in patients with hairy cell leukemia. *Blood* 1998; 91: 4224-4231.
- 20 36. Sarzotti M, Patel DD, Li X, Ozaki DA, Cao S, Langdon S, Parrott RE, Coyne K, Buckley RH. T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J Immunol* 2003; 170: 2711-2718.
37. Mariani S, Coscia M, Even J, Peola S, Foglietta M, Boccadoro M, Sbaiz L, Restagno G, Pileri A, Massaia M. Severe and long-lasting disruption of T-cell receptor diversity in human myeloma after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell infusion. *Br J Haematol* 2001; 113: 1051-1059.
- 25 38. Davis TH, Yockey CE, Balk SP. Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 1993; 142: 1841-1847.
39. Bourguin A, Tung R, Galdi N, Sklar J. Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8536-8540.
- 30 40. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 1994; 83: 3271-3278.
41. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997; 11: 2192-2199.
- 35 42. Kneba M, Bolz I, Linke B, Hiddemann W. Analysis of rearranged T-cell receptor beta-chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood* 1995; 86: 3930-3937.
43. Linke B, Bolz I, Fayyazi A, von Hofen M, Pott C, Bertram J, Hiddemann W, Kneba M. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia* 1997; 11: 1055-1062.
- 40 44. Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 37-57.
- 45 45. Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Schrappe M, Kamps WA, Masera G, Gadner H, Riehm H, Bartram CR, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; 99: 4386-4393.
- 50 46. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 307-310.
47. Lefranc MP. IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia* 2003; 17: 260-266.
48. Ignatovich O, Tomlinson IM, Jones PT, Winter G. The creation of diversity in the human immunoglobulin V(lambda) repertoire. *J Mol Biol* 1997; 268: 69-77.

49. Tümkaya T, van der Burg M, Garcia Sanz R, Gonzalez Diaz M, Langerak AW, San Miguel JF, van Dongen JJM. Immunoglobulin lambda isotype gene rearrangements in B-cell malignancies. *Leukemia* 2001; 15: 121-127.
50. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995; 42: 455-500.
51. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996; 272: 1755-1762.
52. Quertermous T, Strauss WM, Van Dongen JJ, Seidman JG. Human T cell gamma chain joining regions and T cell development. *J Immunol* 1987; 138: 2687-2690.
53. Rabbitts P, Douglas J, Fischer P, Nacheva E, Karpas A, Catovsky D, Melo J, Baer R, Stinson M, Rabbitts T. Chromosome abnormalities at 11q13 in B cell tumours. *Oncogene* 1988; 3: 99-103.
54. Williams ME, Swerdlow SH, Meeker TC. Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia* 1993; 7: 1437-1440.
55. Segal GH, Masih AS, Fox AC, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC. CD5-expressing B-cell non-Hodgkin's lymphomas with bcl-1 gene rearrangement have a relatively homogeneous immunophenotype and are associated with an overall poor prognosis. *Blood* 1995; 85: 1570-1579.
56. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998; 188: 2151-2162.
57. Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today* 1998; 19: 480-485.
58. Corbett SJ, Tomlinson IM, Sonnhhammer ELL, Buck D, Winter G. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 1997; 270: 587-597.
59. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J* 1988; 7: 4141-4150.
60. Bertrand FE, III, Billips LG, Burrows PD, Gartland GL, Kubagawa H, Schroeder HW, Jr. Ig D(H) gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow. *Blood* 1997; 90: 736-744.
61. Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med* 1996; 184: 2217-2229.
62. Szczepanski T, Willemse MJ, van Wering ER, Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJM. Precursor-B-ALL with DH-JH gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001; 15: 1415-1423.
63. Davi F, Faili A, Gritti C, Blanc C, Laurent C, Sutton L, Schmitt C, Merle-Beral H. Early onset of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal human bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1997; 90: 4014-4021.
64. Szczepanski T, van 't Veer MB, Wolvers-Tettero ILM, Langerak AW, van Dongen JJM. Molecular features responsible for the absence of immunoglobulin heavy chain protein synthesis in an IgH(-) subgroup of multiple myeloma. *Blood* 2000; 96: 1087-1093.
65. Schroeder HW, Jr. y Wang JY. Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6146-6150.
66. Raaphorst FM, Raman CS, Tami J, Fischbach M, Sanz I. Human Ig heavy chain CDR3 regions in adult bone marrow pre-B cells display an adult phenotype of diversity: evidence for structural selection of DH amino acid sequences. *Int Immunol* 1997; 9: 1503-1515.
67. Lebecque SG y Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 1990; 172: 1717-1727.
68. Fukita Y, Jacobs H, Rajewsky K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 1998; 9: 105-114.

69. Zachau HG. The Immunologist 1996; 4: 49-54.
70. Schable KF y Zachau HG. The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. Biol Chem Hoppe Seyler 1993; 374: 1001-1022.
71. Weichhold GM, Ohnheiser R, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. Genomics 1993; 16: 503-511.
72. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. Nature 1985; 316: 260-262.
73. Szczepanski T, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, Ossenkoppele GJ, Verhoef G, Stul M, Petersen EJ, de Bruijn MAC, van't Veer MB, van Dongen JJM. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemia are less mature in adults than in children: implications for selection of PCR targets for detection of minimal residual disease. Leukemia 1998; 12: 1081-1088.
74. Van der Velden VHJ, Willemse MJ, van der Schoot CE, van Wering ER, van Dongen JJM. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. Leukemia 2002; 16: 928-936.
75. van der Burg M, Tumkaya T, Boerma M, de Bruin-Versteeg S, Langerak AW, van Dongen JJM. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. Blood 2001; 97: 1001-1008.
76. Cannell PK, Amlot P, Attard M, Hoffbrand AV, Foroni L. Variable kappa gene rearrangement in lymphoproliferative disorders: an analysis of V kappa gene usage, VJ joining and somatic mutation. Leukemia 1994; 8: 1139-1145.
77. Fripiat JP, Williams SC, Tomlinson IM, Cook GP, Cherif D, Le Paslier D, Collins JE, Dunham I, Winter G, Lefranc MP. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. Hum Mol Genet 1995; 4: 983-991.
78. Williams SC, Fripiat JP, Tomlinson IM, Ignatovich O, Lefranc MP, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. J Mol Biol 1996; 264: 220-232.
79. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Schmeits JL, Wang J, Shimizu N. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. Genome Res 1997; 7: 250-261.
80. Hieter PA, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. Nature 1981; 290: 368-372.
81. Vasicek TJ y Leder P. Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. J Exp Med 1990; 172: 609-620.
82. Taub RA, Hollis GF, Hieter PA, Korsmeyer S, Waldmann TA, Leder P. Variable amplification of immunoglobulin lambda light-chain genes in human populations. Nature 1983; 304: 172-174.
83. van der Burg M, Barendregt BH, van Gastel-Mol EJ, Tumkaya T, Langerak AW, van Dongen JJ. Unraveling of the polymorphic C lambda 2-C lambda 3 amplification and the Ke+Oz-polymorphism in the human Ig lambda locus. J Immunol 2002; 169: 271-276.
84. Bridges SL, Jr. Frequent N addition and clonal relatedness among immunoglobulin lambda light chains expressed in rheumatoid arthritis synovia and PBL, and the influence of V lambda gene segment utilization on CDR3 length. Mol Med 1998; 4: 525-553.
85. Kiyoi H, Naito K, Ohno R, Saito H, Naoe T. Characterization of the immunoglobulin light chain variable region gene expressed in multiple myeloma. Leukemia 1998; 12: 601-609.
86. Farner NL, Dorner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. J Immunol 1999; 162: 2137-2145.
87. Ignatovich O, Tomlinson IM, Popov AV, Bruggemann M, Winter G. Dominance of intrinsic genetic factors in shaping the human immunoglobulin Vlambda repertoire. J Mol Biol 1999; 294: 457-465.
88. Wei S, Charmley P, Robinson MA, Concannon P. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. Immunogenetics 1994; 40: 27-36.
89. Charmley P, Wei S, Concannon P. Polymorphisms in the TCRB-V2 gene segments localize the Tcrb orphon genes to human chromosome 9p21. Immunogenetics 1993; 38: 283-286.

90. Robinson MA, Mitchell MP, Wei S, Day CE, Zhao TM, Concannon P. Organization of human T-cell receptor beta-chain genes: clusters of V beta genes are present on chromosomes 7 and 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2433-2437.
- 5 91. Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, Mak TW. Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8624-8628.
92. Liu D, Callahan JP, Dau PC. Intrafamily fragment analysis of the T cell receptor beta chain CDR3 region. *J Immunol Methods* 1995; 187: 139-150.
- 10 93. Tsuda S, Rieke S, Hashimoto Y, Nakauchi H, Takahama Y. IL-7 supports D-J but not V-DJ rearrangement of TCR-beta gene in fetal liver progenitor cells. *J Immunol* 1996; 156: 3233-3242.
94. Weidmann E, Whiteside TL, Giorda R, Herberman RB, Trucco M. The T-cell receptor V beta gene usage in tumor-infiltrating lymphocytes and blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 5913-5920.
- 15 95. Jores R y Meo T. Few V gene segments dominate the T cell receptor beta-chain repertoire of the human thymus. *J Immunol* 1993; 151: 6110-6122.
96. Rosenberg WM, Moss PA, Bell JI. Variation in human T cell receptor V beta and J beta repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 1992; 22: 541-549.
- 20 97. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJM. Primers and protocols for standardized MRD detection in ALL using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110-118.
- 25 98. Hansen-Hagge TE, Yokota S, Bartram CR. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood* 1989; 74: 1762-1767.
99. Cave H, Guidal C, Rohrlich P, Delfau MH, Broyart A, Lescoeur B, Rahimy C, Fenneteau O, Monplaisir N, d'Auriol L, Elion J, Vilmer E, Grandchamp B. Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of delta and gamma T-cell receptor genes. *Blood* 1994; 83: 1892-1902.
- 30 100. Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissela B, Kissella B, Keever C, Flomenberg N. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J Immunol* 1994; 152: 5109-5119.
- 35 101. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH, Matutes E, Wiedemann LM. The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 1991; 138: 821-828.
102. Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Muller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood* 2000; 96: 640-646.
- 40 103. O'Shea U, Wyatt JI, Howdle PD. Analysis of T cell receptor beta chain CDR3 size using RNA extracted from formalin fixed paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 1997; 50: 811-814.
104. Duby AD y Seidman JG. Abnormal recombination products result from aberrant DNA rearrangement of the human T-cell antigen receptor beta-chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4890-4894.
- 45 105. Alatrakchi N, Farace F, Frau E, Carde P, Munck JN, Triebel F. T-cell clonal expansion in patients with B-cell lymphoproliferative disorders. *J Immunother* 1998; 21: 363-370.
106. Blom B, Verschuren MC, Heemskerk MH, Bakker AQ, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJM, Spits H. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 1999; 93: 3033-3043.
- 50 107. Chen Z, Font MP, Loiseau P, Bories JC, Degos L, Lefranc MP, Sigaux F. The human T-cell V gamma gene locus: cloning of new segments and study of V gamma rearrangements in neoplastic T and B cells. *Blood* 1988; 72: 776-783.
- 55 108. Zhang XM, Tonnelle C, Lefranc MP, Huck S. T cell receptor gamma cDNA in human fetal liver and thymus: variable regions of gamma chains are restricted to V gamma I or V9, due to the absence of splicing of the V10 and V11 leader intron. *Eur J Immunol* 1994; 24: 571-578.

109. Huck S y Lefranc MP. Rearrangements to the JP1, JP and JP2 segments in the human T-cell rearranging gamma gene (TRG gamma) locus. *FEBS Lett* 1987; 224: 291-296.
110. Delfau MH, Hance AJ, Lecossier D, Vilmer E, Grandchamp B. Restricted diversity of V gamma 9-JP rearrangements in unstimulated human gamma/delta T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2437-2443.
111. Porcelli S, Brenner MB, Band H. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol Rev* 1991; 120: 137-183.
112. Van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002; 16: 1372-1380.
113. Szczepanski T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero ILM, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect "end-stage" recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2000; 14: 1208-1214.
114. Delabesse E, Burtin ML, Millien C, Madonik A, Arnulf B, Beldjord K, Valensi F, Macintyre EA. Rapid, multicolor fluorescent TCRG Vgamma and Jgamma typing: application to T cell acute lymphoblastic leukemia and to the detection of minor clonal populations. *Leukemia* 2000; 14: 1143-1152.
115. Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, van Dongen JJ. T-cell receptor V delta-J alpha rearrangements in human thymocytes: the role of V delta-J alpha rearrangements in T-cell receptor-delta gene deletion. *Immunology* 1998; 93: 208-212.
116. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. *Immunogenetics* 1995; 42: 451-453.
117. Kabelitz D, Wesch D, Hinz T. Gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 55-75.
118. Shen J, Andrews DM, Pandolfi F, Boyle LA, Kersten CM, Blatman RN, Kurnick JT. Oligoclonality of Vdelta1 and Vdelta2 cells in human peripheral blood mononuclear cells: TCR selection is not altered by stimulation with gram-negative bacteria. *J Immunol* 1998; 160: 3048-3055.
119. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Hählen K, Van Wering ER, Van Dongen JJM. Extensive junctional diversity of gd T-cell receptors expressed by T-cell acute lymphoblastic leukemias: implications for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1991; 5: 1076-1086.
120. Langlands K, Eden OB, Micallef-Eynaud P, Parker AC, Anthony RS. Direct sequence analysis of TCR V delta 2-D delta 3 rearrangements in common acute lymphoblastic leukaemia and application to detection of minimal residual disease. *Br J Haematol* 1993; 84: 648-655.
121. Schneider M, Panzer S, Stolz F, Fischer S, Gadner H, Panzer-Grumayer ER. Crosslineage TCR delta rearrangements occur shortly after the DJ joinings of the IgH genes in childhood precursor B ALL and display age-specific characteristics. *Br J Haematol* 1997; 99: 115-121.
122. Hettinger K, Fischer S, Panzer S, Panzer-Grumayer ER. Multiplex PCR for TCR delta rearrangements: a rapid and specific approach for the detection and identification of immature and mature rearrangements in ALL. *Br J Haematol* 1998; 102: 1050-1054.
123. Theodorou I, Raphael M, Bigorgne C, Fourcade C, Lahet C, Cochet G, Lefranc MP, Gaulard P, Farcet JP. Recombination pattern of the TCR gamma locus in human peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol* 1994; 174: 233-242.
124. Kanavaros P, Farcet JP, Gaulard P, Haioun C, Divine M, Le Couedic JP, Lefranc MP, Reyes F. Recombinative events of the T cell antigen receptor delta gene in peripheral T cell lymphomas. *J Clin Invest* 1991; 87: 666-672.
125. Przybylski GK, Wu H, Macon WR, Finan J, Leonard DG, Felgar RE, DiGiuseppe JA, Nowell PC, Swerdlow SH, Kadin ME, Wasik MA, Salhany KE. Hepatosplenic and subcutaneous panniculitis-like gamma/delta T cell lymphomas are derived from different Vdelta subsets of gamma/delta T lymphocytes. *J Mol Diagn* 2000; 2: 11-19.
126. Kadin ME. Cutaneous gamma delta T-cell lymphomas-how and why should they be recognized? *Arch Dermatol* 2000; 136: 1052-1054.
127. Hodges E, Quin C, Farrell AM, Christmas S, Sewell HF, Doherty M, Powell RJ, Smith JL. Arthropathy, leucopenia and recurrent infection associated with a TcR gamma delta population. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 978-983.

128. Van Oostveen JW, Breit TM, de Wolf JT, Brandt RM, Smit JW, van Dongen JJM, Borst J, Melief CJ. Polyclonal expansion of T-cell receptor-gd+ T lymphocytes associated with neutropenia and thrombocytopenia. *Leukemia* 1992; 6: 410-418.
129. Triebel F, Faure F, Mami-Chouaib F, Jitsukawa S, Griscelli A, Genevee C, Roman-Roman S, Hercend T. A novel human V delta gene expressed predominantly in the Ti gamma A fraction of gamma/delta+ peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol* 1988; 18: 2021-2027.
130. De Boer CJ, van Krieken JH, Schuurin E, Kluin PM. Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol* 1997; 8: 109-117.
131. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984; 224: 1403-1406.
132. Vaandrager JW, Kleiverda JK, Schuurin E, Kluin-Nelemans JC, Raap AK, Kluin PM. Cytogenetics on released DNA fibers. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81: 306-311.
133. Vaandrager JW, Schuurin E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK, Kluin PM. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996; 88: 1177-1182.
134. Pott C, Tiemann M, Linke B, Ott MM, von Hofen M, Bolz I, Hiddemann W, Parwaresch R, Kneba M. Structure of Bcl-1 and IgH-CDR3 rearrangements as clonal markers in mantle cell lymphomas. *Leukemia* 1998; 12: 1630-1637.
135. Luthra R, Hai S, Pugh WC. Polymerase chain reaction detection of the t(11;14) translocation involving the bcl-1 major translocation cluster in mantle cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4: 4-7.
136. de Boer CJ, Schuurin E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, van Krieken JH. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995; 86: 2715-2723.
137. Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurin E, Kluin PM. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002; 198: 163-170.
138. Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, Jauch A, Kluin PM, Geelen E, Bergsagel PL, Kuehl WM, Drexler HG, Otsuki T, Bartram CR, Schuurin E. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 2000; 95: 2691-2698.
139. Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand R, Vekemans M, Flandrin G, Macintyre EA. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol* 1998; 101: 712-721.
140. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurin E, Kluin PM. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995; 85: 2528-2536.
141. Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res* 1979; 39: 3119-3128.
142. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317: 1185-1189.
143. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899-906.
144. Cleary ML y Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7439-7443.
145. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59: 1693s-1700s.
146. Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 411-417.
147. Woodland RT, Schmidt MR, Korsmeyer SJ, Gravel KA. Regulation of B cell survival in xid mice by the proto-oncogene bcl-2. *J Immunol* 1996; 156: 2143-2154.

148. Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology* 1996; 137: 4837-4843.
- 5 149. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987; 237: 175-178.
150. Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Weiss PD, Griffith RC, Korsmeyer SJ. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 4869-4873.
- 10 151. Lee MS. Molecular aspects of chromosomal translocation t(14;18). *Semin Hematol* 1993; 30: 297-305.
152. Buchonnet G, Lenain P, Ruminy β, Lepretre S, Stamatoullas A, Parmentier F, Jardin F, Duval C, Tilly H, Bastard C. Characterisation of BCL2-JH rearrangements in follicular lymphoma: PCR detection of 3' BCL2 breakpoints and evidence of a new cluster. *Leukemia* 2000; 14: 1563-1569.
153. Cleary ML, Galili N, Sklar J. Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1986; 164: 315-320.
154. Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H, Yamabe H, Fukuhara S, Okuma M. Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 17-29.
- 20 155. Willis TG, Jadayel DM, Coignet LJ, Abdul-Rauf M, Treleaven JG, Catovsky D, Dyer MJ. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* 1997; 90: 2456-2464.
156. Yabumoto K, Akasaka T, Muramatsu M, Kadowaki N, Hayashi T, Ohno H, Fukuhara S, Okuma M. Rearrangement of the 5' cluster region of the BCL2 gene in lymphoid neoplasm: a summary of nine cases. *Leukemia* 1996; 10: 970-977.
- 25 157. Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter KC, Mason DY. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1990; 76: 58-64.
158. Turner GE, Ross FM, Krajewski AS. Detection of t(14;18) in British follicular lymphoma using cytogenetics, Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1995; 89: 223-225.
- 30 159. Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 85-94.
160. Vaandrager JW, Schuurin E, Kluin-Nelemans HC, Dyer MJ, Raap AK, Kluin PM. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 2871-2878.
- 35 161. Jacobson JO, Wilkes BM, Kwiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Harris NL. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 1993; 72: 231-236.
- 40 162. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D, Selby P, Linch DC. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88: 1046-1051.
163. Vaandrager JW, Schuurin E, Philippo K, Kluin PM. V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood* 2000; 96: 1947-1952.
- 45 164. Fenton JA, Vaandrager JW, Aarts WM, Bende RJ, Heering K, van Dijk M, Morgan G, van Noesel CJ, Schuurin E, Kluin PM. Follicular lymphoma with a novel t(14;18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch mu region indicates an origin from germinal center B cells. *Blood* 2002; 99: 716-718.
- 50 165. Alaiabac M, Filotico R, Giannella C, Paradiso A, Labriola A, Marzullo F. The effect of fixation type on DNA extracted from paraffin-embedded tissue for PCR studies in dermatopathology. *Dermatology* 1997; 195: 105-107.
166. An SF y Fleming KA. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol* 1991; 44: 924-927.

167. Camilleri-Broet S, Devez F, Tissier F, Ducruit V, Le Tourneau A, Diebold J, Audouin J, Molina T. Quality control and sensitivity of polymerase chain reaction techniques for the assessment of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements from fixed- and paraffin-embedded samples. *Ann Diagn Pathol* 2000; 4: 71-76.
- 5 168. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 117-124.
169. Legrand B, Mazancourt P, Durigon M, Khalifat V, Crainic K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Sci Int* 2002; 125: 205-211.
- 10 170. Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA. In vitro amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumour DNA and from paraffin wax embedded tissues using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1989; 42: 840-846.
171. Longy M, Duboue B, Soubeyran P, Moynet D. Method for the purification of tissue DNA suitable for PCR after fixation with Bouin's fluid. Uses and limitations in microsatellite typing. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 167-173.
- 15 172. Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 265-271.
173. Tbakhi A, Totos G, Pettay JD, Myles J, Tubbs RR. The effect of fixation on detection of B-cell clonality by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1999; 12: 272-278.
- 20 174. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 118-126.
175. Chan PK, Chan DP, To KF, Yu MY, Cheung JL, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 2001; 54: 401-403.
- 25 176. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: e12.
177. Wickham CL, Boyce M, Joyner MV, Sarsfield P, Wilkins BS, Jones DB, Ellard S. Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies. *Mol Pathol* 2000; 53: 19-23.
- 30 178. Cawkwell L y Quirke P. Direct multiplex amplification of DNA from a formalin fixed, paraffin wax embedded tissue section. *Mol Pathol* 2000; 53: 51-52.
179. Diaz-Cano SJ y Brady SP. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 342-346.
- 35 180. Hoeve MA, Krol AD, Philippo K, Derksen PW, Veenendaal RA, Schuurin E, Kluin PM, van Krieken JH. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *Mol Pathol* 2000; 53: 194-200.
181. Zhou XG, Sandvej K, Gregersen N, Hamilton-Dutoit SJ. Detection of clonal B cells in microdissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Mol Pathol* 1999; 52: 104-110.
- 40

Tabla 1. Linaje B, T y NK de neoplasias malignas linfoides^a

Linaje	LLA		Leucemias linfocíticas crónicas	Linfomas no Hodgkin			Mieloma múltiple
	infancia	adulto		nodular	extranod.	piel	
B	82 - 86%	75 - 80%	95 - 97%	95 - 97%	90 - 95%	30 - 40%	100%
T	14 - 18%	20 - 25%	3 - 5%	3 - 5%	5 - 10%	60 - 70%	0%
NK	< 1%	< 1%	1 - 2%	< 2%	< 2%	< 2%	0%

^a Véase Van Dongen et al. 1991 ¹, Jaffe et al. 2001 ², y Van Dongen et al. 2002 ³

Tabla 2. Número estimado de segmentos génicos V, D y J humanos no polimórficos que pueden estar implicados potencialmente en los reordenamientos de los genes de Ig o TCR^a

Segmento génico	IGH	IGK	IGL	TCRA	TCRB	TCRG	TCRD
Segmentos V							
- funcionales (familia)	44 (7)	43 (7)	38 (10)	46 (32)	47 (23)	6 (4)	8
- reordenables (familia)	66 (7) ^b	76 (7)	56 (11)	54 (32)	67 (30)	9 (4)	8
Segmentos D							
- reordenables (familia)	27 (7)	-	-	-	2	-	3
Segmentos J							
- funcionales	6 ^c	5 ^d	4	53	13	5	4
- reordenables	6 ^c	5 ^d	5 ^e	61	13	5	4

a. Solamente los segmentos génicos no polimórficos con una RSS adecuada están incluidos en esta tabla.

b. Esta estimación no incluye los pseudogenes VH (generalmente truncados) descubiertos recientemente, que están agrupados en tres clanes.

c. Los seis segmentos génicos J_H son sumamente homólogos a lo largo de un tramo de ~20 nucleótidos, lo que es suficiente para el diseño de un cebador consenso.

d. Los segmentos J_K tienen una homología elevada, lo que permite el diseño de 2 a 3 cebadores consenso J_K.

e. Cinco de los siete segmentos génicos J_λ tienen una RSS adecuada.

Tabla 3. Protocolo de PCR estandarizado

Condiciones de reacción.

- tampón: tampón ABI II o tampón ABI Gold
- volumen final de 50 µl
- 100 ng de ADN
- 10 pmol de cada cebador (sin marcar o marcado con 6-FAM) (independientemente del número total de cebadores en cada tubo de PCR multiplex)
- dNTP: concentración final 200 µM
- MgCl₂: concentración final 1,5 mM (a ser optimizada para cada objetivo)
- enzima Taq^a: 1 U en la mayoría de los tubos; 2 U en los tubos con muchos cebadores (>15)

Condiciones de termociclado

- pre-activación 7 min. a 95 °C
- temperatura de renaturalización: 60 °C
- tiempos de termociclado:

	Equipo de PCR "clásica"	Equipo de PCR "moderna"
- desnaturalización	45 seg.	30 seg.
- renaturalización	≥45 seg.	≥30 seg.
- extensión	1,30 min.	≥30 seg.
- extensión final	≥10 min.	≥10 min.

- número de ciclos: 35
- mantenimiento a 15 °C (o temperatura ambiente)

a. Se usó AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) en combinación con tampón ABI II 1x o tampón ABI Gold 1x (Applied Biosystems), dependiendo del objetivo.

Tabla 4. Protocolo estandarizado para el análisis heterodúplex de productos de PCR

<i>Preparación de productos de PCR</i>
- tubo con 10-20 µl de producto de PCR - desnaturalización del producto de PCR: 5 min. a 95 °C - renaturalización del producto de PCR: 60 min. a 4 °C
<i>Condiciones de electroforesis (geles de poliacrilamida no comerciales)</i>
- gel: poliacrilamida no desnaturalizante al 6% (acrilamida: bisacrilamida 29: 1) - tampón: TBE 0,5 x - tampón de carga: 5 µl de tampón de carga de azul de bromofenol no desnaturalizante helado - electroforesis: generalmente 2-3 horas a 110 V o durante la noche a 40-50 V^a
<i>Condiciones de electroforesis (geles de poliacrilamida comerciales)</i>
- gel: poliacrilamida no desnaturalizante (p.ej., BioRad PreCast Gel System o Amersham Pharmacia Biotech Gene Gel Excel Kit) - tampón: TBE 1 x - tampón de carga: tampón de carga de azul de bromofenol no desnaturalizante helado - electroforesis: 1,5 horas a 100 V
<i>Visualización</i>
- tinción: 5-10 min. en 0,5 µg/ml de EtBr en H₂O - decoloración / lavado: 2x 5-10 min. en H₂O - visualización: iluminación UV - alternativa: tinción de plata mediante el uso del equipo de tinción Amersham Pharmacia Biotech DNA Silver
a. El voltaje y la duración de la electroforesis dependen de los tamaños de los amplicones de PCR, el grosor del gel de poliacrilamida, y el tipo de equipo de PCR, y se deberían adaptar en consecuencia

Tabla 5. Protocolo estandarizado para el análisis GeneScan de los productos de PCR

A. Secuenciadores basados en gel
<i>Preparación de los productos de PCR</i>
- dilución de los productos de PCR: inicialmente 1: 10 en formamida o H₂O (se puede alterar si la señal fluorescente está fuera del intervalo óptimo; véanse las condiciones de electroforesis) - volumen de muestra: 2 µl de producto de PCR diluido - volumen de tampón de carga: 0,5 µl de tampón de carga de azul de dextrano + 0,5 µl de patrón interno TAMRA + 2 µl de formamida desionizada - desnaturalización del producto de PCR: 2 min. a 95 °C o a temperatura superior - enfriamiento del producto de PCR a 4 °C

Condiciones de electroforesis

6. gel: poliacrilamida desnaturalizante al 5%

7. tampón: TBE 1 x

8. electroforesis: 2-3,5 horas^a (véase la Tabla 25)

9. intensidad de la señal de fluorescencia óptima:

- 600-4.000 unidades de fluorescencia (373 plataformas)
- 400-7.000 unidades de fluorescencia (377 plataformas)

B. Secuenciadores capilares (a optimizar para cada secuenciador)*Preparación de los productos de PCR*

1. 1 µl de producto de PCR (el volumen del producto de PCR o los tiempos de muestreo se pueden alterar si la señal fluorescente está fuera del intervalo óptimo; véanse las condiciones de electroforesis)

2. volumen de muestra: 1 µl de producto de PCR + 9,5 µl de formamida (Hi-Di) + 0,5 µl de patrón interno de análisis heterodúplex ROX-400

3. desnaturalización del producto de PCR: 2 min. a 95 °C o temperatura superior

4. enfriamiento del producto de PCR a 4 °C durante una hora

Condiciones de electroforesis

5. gel: polímero 3100 POP4

6. tampón: tampón 3100 1x con EDTA

7. electroforesis: 45 minutos^e

8. intensidad de señal fluorescente óptima:

- hasta 10.000 unidades de fluorescencia

^a La duración de la electroforesis depende de los tamaños de los amplicones y de la plataforma empleada.^b Para el capilar de 36 cm, el tiempo empleado depende del capilar usado.**Tabla 6. Sensibilidad de la detección de los ordenamientos de TCRB clonales**

Tubo de TCRB	Par de cebadores implicado		Control Clonal	Tamaño del producto de PCR	Sensibilidad de detección	
	V	J			PCR simple ^a	PCR multiplex
tubo A	Vβ2	Jβ1.2	paciente	261 nt	1-5%	5%
	Vβ2	Jβ1.3	paciente	267 nt	5%	5%
	Vβ2	Jβ1.6	paciente	267 nt		<5%
	Vβ7	Jβ2.2	paciente	254 nt		10%
	Vβ8a	Jβ1.2	Jurkat	267 nt	0,1%	0,5 - 1%
	Vβ8a	Jβ2.7	paciente	264 nt		10%
	Vβ10	Jβ2.7	PEER	263 nt		20%
	Vβ3/12a/13a/15	Jβ1.6	paciente	278 nt	< 5%	5%
	Vβ3/12a/13a/15	Jβ2.7	paciente	286 nt		10%
	Vβ17	Jβ2.7	RPMI-8402	260 nt		10%

	Vβ17	Jβ1.1	paciente	260 nt	1%	10%
	Vβ18	Jβ1.2	DND41	261 nt	1%	10%
	Vβ22	Jβ1.1	paciente	265 nt	0,1%	10%
	Vβ8b/23	Jβ1.2	H9	257 nt	0,1%	0,5%
	Vβ24	Jβ1.5	RPMI-8402	264 nt	0,5%	10%
tubo B	Vβ2	Jβ2.1	Molt-4	267 nt	5%	5%
	Vβ1/5	Jβ2.1	paciente	266 nt	5%	1-5%
	Vβ6a/11	Jβ2.1	paciente	265 nt	1%	5%
	Vβ6a/11	Jβ2.5	paciente	258 nt		5%
	Vβ7	Jβ2.3	PEER	271 nt		<5%
	Vβ8a	Jβ2.1	paciente	293 nt	0,1%	1%
	Vβ3/12a/13a/15	Jβ2.1	paciente	258 nt	5%	10%
	Vβ3/12a/13a/15	Jβ2.3	paciente	258 nt		<5%
	Vβ16	Jβ2.1	paciente	258 nt	0,5%	10%
	Vβ17	Jβ2.5	CML-T1	270 nt	0,1 - 1%	1%
	Vβ21	Jβ2.3	paciente	282 nt	0,5%	<10%
tubo C	Dβ1	Jβ1.1	paciente	304 nt	0,10%	<5%
	Dβ1	Jβ1.2	paciente	306 nt	5%	5%
	Dβ1	Jβ1.4	paciente	310 nt		5-10%
	Dβ1	Jβ1.6	paciente	320 nt		20%
	Dβ1	Jβ2.1	paciente	309 nt	5%	20%
	Dβ1	Jβ2.7	paciente	307 nt		<5%
	Dβ1	Jβ2.5	paciente	310 nt		<1%
	Dβ2	Jβ1.4	paciente	182 nt		<1%
	Dβ2	Jβ2.1	paciente	185 nt	1%	<5%
	Dβ2	Jβ2.5	paciente	191 nt		5%

a. El experimento de dilución para determinar la sensibilidad de la PCR simple no se llevó a cabo en cada caso.

Tabla 7. Sensibilidad de detección de reordenamientos del gen *TCRD* clonales

Reordenamiento de <i>TCRD</i>	Muestra de control clonal (tamaño aproximado)		Sensibilidad de detección mediante heterodúplex
Vδ1-Jδ1	paciente	(200 nt)	5%
	paciente	(190 nt)	1-5%
	paciente	(200 nt)	5%
Vδ2-Jδ1	paciente	(200 nt)	5%
	paciente	(220 nt)	5%
	paciente	(210 nt)	5%
Vδ2-Jδ3	paciente	(220 nt)	5%
Vδ3-Jδ1	paciente	(270 nt)	5%
Vδ6-Jδ2	Loucy	(210 nt)	0,5%
	paciente	(210 nt)	10%
Dδ2-Jδ1	Loucy	(150 nt)	0,2%
	paciente	(160 nt)	0,5%

	paciente	(135 nt)	0,5%
Dδ2-Jδ3	paciente	(150 nt)	5%
Dδ2-Dδ3	NALM-16	(170 nt)	1%
	paciente	(200 nt)	1%
	paciente	(190 nt)	0,5%
	paciente	(170 nt)	0,5%
Vδ2-Dδ3	REH	(240 nt)	5-10%
	NALM-16	(230 nt)	1-5%
	paciente	(250 nt)	5%

Tabla 8. Concordancia entre los resultados de PCR multiplex y los resultados de análisis de transferencia de Southern (SB) (PCR/SB) de los reordenamientos de los genes de Ig/TCR por (sub)categoría de las muestras congeladas incluidas

Diagnóstico	<i>IGH</i> ^a	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>	<i>TCRB</i>	<i>TCRG</i>	<i>TCRD</i>
Pre-folicular (n=8)	C ^b : 8/8 P ^b : 0/0	C: 8/8 P: 0/0	C: 4/4 P: 4/4	C: 2/4 ^b P: 4/4	C: 0/0 P: 8/8	C: 0/0 P: 8/8 ^e
LLC-B (n=16)	C: 15/16 P: 0/0	C: 16/16 P: 0/0	C: 5/5 P: 9/11	C: 1/1 P: 15/15	C: 0/0 P: 16/16	C: 2/2 P: 14/14
(post-)folicular (n = 25)	C: 22/25 ^b P: 0/0	C: 19/24 ^c P: 0/1	C: 3/5 P: 19/20	C: 2/4 P: 21/21 ^{d,e}	C: 0/1 P: 22/24	C: 0/0 P: 24/25 ^e
Todas neop. malign. de células B (n = 49)	C: 45/49 P: 0/0	C: 43/48 P: 0/1	C: 12/14 P: 32/35	C: 4/8 P: 41/41	C: 0/1 P: 46/48	C: 2/2 P: 46/47
Neop. malign. de células T (n = 18)	C: 2/2 P: 15/16 ^e	C: 0/0 P: 17/18	C: 0/0 P: 17/18	C: 17/17 ^c P: 1/1	C: 15/16 ^b P: 1/2	C: 2/3 P: 14/15 ^e
Muestras reactivas (n=15)	C: 0/0 P: 15/15	C: 0/0 P: 15/15	C: 0/0 P: 15/15	C: 0/0 P: 14/15	C: 0/0 P: 15/15	C: 0/0 P: 15/15
Miscelánea (n=8)	C: 3/3 P: 3/5	C: 2/2 P: 4/6	C: 0/0 P: 6/8	C: 3/3 P: 5/5 ^{d, d}	C: 1/1 P: 6/7	C: 1/1 P: 5/7
Todas las muestras (n=90)	C: 50/54 P: 33/36	C: 45/50 P: 36/40	C: 12/14 P: 70/76	C: 25/29 P: 60/61	C: 16/18 P: 68/72	C: 5/6 P: 80/84
a. Incluye el análisis de PCR tanto de VH-JH como de DH-JH b. C, reordenamientos clonales; P, reordenamientos policlonales c. En una muestra, clonalidad en análisis GeneScan solamente d. En una muestra, clonalidad en análisis heterodúplex solamente e. En una muestra, policlonalidad en análisis GeneScan solamente f. En una muestra, policlonalidad en análisis heterodúplex solamente						

Tabla 9. Complementariedad de diferentes objetivos de PCR multiplex de Ig para la detección de la clonalidad en neoplasias malignas de células B definidas mediante transferencia de Southern

Tubos de PCR multiplex	Diagnóstico ^a			
	Centro pre-germinal B (n=8)	LLC-B (n=16)	Centro (post-) germinal B (n=25)	Todas las neop. malign. de células B (n=49)

<i>IGH</i> VH-JH FR1	8/8 ^b (100 %)	14/16 ^c (88 %)	15/25 ^b (60 %)	37/49 (76 %)
<i>IGH</i> VH-JH FR2	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	14/25 ^b (56 %)	37/49 (76 %)
<i>IGH</i> VH-JH FR3	8/8 (100 %)	14/16 (88 %)	11/25 ^c (44 %)	33/49 (67 %)
<i>IGH</i> VH-JH 3FR	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	17/25 (68 %)	40/49 (82 %)
<i>IGH</i> D _H -J _H	0/8 (0 %)	11/16 (69 %)	11/25 (44 %)	22/49 (45 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGH</i> DH-JH	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	22/25 (88 %)	45/49 (92 %)
<i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	21/25 ^d (84 %)	45/49 (92 %)
<i>IGL</i>	4/8 (50 %)	7/16 ^e (44 %)	4/25 ^f (16 %)	15/49 (31 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	21/25 (84 %)	45/49 (92 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGL</i>	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	17/25 (68 %)	40/49 (82 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGH</i> DH-JH + <i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	24/25 (96 %)	48/49 (98 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGH</i> DH-JH + <i>IGK</i> + <i>IGL</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	24/25 (96 %)	48/49 (98 %)

a. Todas las muestras tienen reordenamientos génicos clonales en al menos el locus de *IGH*, tal como se determinó mediante análisis de transferencia de Southern.

b. Dos casos mostraron productos clonales en el análisis GeneScan, pero productos policlonales en el análisis heterodúplex

c. Un caso mostró productos clonales en el análisis GeneScan, pero productos policlonales en el análisis heterodúplex

d. Incluyendo el caso 25-NL-4 con reordenamientos del gen *IGH* clonales débiles pero del gen *IGK* policlonales en el análisis mediante transferencia de Southern

e. Incluyendo los casos 11-NL-19 y 12-ES-1 con reordenamientos de los genes *IGH* + *IGK* clonales pero del gen *IGL* policlonales en el análisis de transferencia de Southern

Tabla 10. Condiciones y muestras de control para el análisis de PCR multiplex de los reordenamientos de los genes de Ig / TCR y las translocaciones t(11;14) y t(14;18)

PCR multiplex	Tubos	Condiciones de PCR			Controles positivos (ejemplos)	
		tampón	TaqGold (U)	MgCl ₂ (mM)	policlonal	Monoclonal ^a
<i>IGH</i> VH-JH	A / B / C	Gold / II	1	1,5	amígdala	A: NALM-6; SU-DHL-5; SU-DHL-6 B: NALM-6; SU-DHL-5; SU-DHL-6 C: NALM-6; SU-DHL-5; SU-DHL-6
<i>IGH</i> DH-JH	D / E	Gold	1	1,5	amígdala	D: KCA; ROS15 E: HSB-2, HPB-ALL
<i>IGK</i>	A / B	Gold / II	1	1,5	amígdala	A: KCA; ROS15 B: ROS15, 380

<i>IGL</i>	A	Gold / II	1	2,5	amígdala	A: CLL-1; EB-4B; KCA
<i>TCRB</i>	A / B / C	II	2 (A, B) ^b 1 (C)	3,0 (A, B) 1,5 (C)	PB-MNC ^c	A: RPMI-8402; Jurkat; PEER; DND-41 B: PEER; CML-T1, MOLT-3 C: Jurkat
<i>TCRG</i>	A / B	II	1	1,5	PB-MNC ^c	A: MOLT-3; RPMI-8402; Jurkat; PEER B: Jurkat; PEER
<i>TCRD</i>	A	II	1	2,0	PB-MNC ^c	A: PEER, REH
<i>BCL1-IGH</i>	A	II	1	2,0	NA ^c	A: JVM 2
<i>BCL2-IGH</i>	A / B / C	II	1	1,5	NA ^c	A: DoHH2; SU-DHL-6 B: K231 ^d C: OZ; SC1 ^d ; SU-DHL-16

a. La mayoría de los controles de las líneas celulares clonales se pueden obtener por medio de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; persona de contacto: Dr. H.G. Drexler (dirección: Departamento de Cultivos Celulares Humanos y Animales, Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Alemania).^{192, 193}

b. En la mayoría de los tubos multiplex solamente es necesaria 1 U de *TaqGold*, pero se necesitan 2 U de *TaqGold* en los tubos A y B de *TCRB* porque contienen >15 cebadores diferentes

c. Abreviaturas: PB-MNC, células mononucleares de sangre periférica; NA, no aplicable.

d. Las líneas celulares positivas para t(14; 18) K231, OZ, y SC1 fueron proporcionadas amablemente por el prof. Martin Dyer, Universidad de Leicester, Leicester, R.U.

Tabla 11. Intervalos de tamaños, bandas inespecíficas, y método de detección en análisis de PCR multiplex de reordenamientos de los genes de Ig/TCR y anormalidades cromosómicas t(11;14) y t(14;18)

PCR multiplex	Intervalo de tamaños (pb)		Bandas inespecíficas (pb)	Método preferido de análisis	Tiempo de func. de GeneScan: gel/capilar
<i>IGH</i> VH-JH	Tubo A:	310-360	Tubo A: ~85	análisis GeneScan y heterodúplex igualmente adecuados	3 - 3,5 h / 45 min
	Tubo B:	250-295	Tubo B: -		
	Tubo C:	100-170	Tubo C: -		
<i>IGH</i> DH-JH	Tubo D:	110-290 (D _H 1/2/4/5/6-J _H) + 390-420 (D _H 3-J _H)	Tubo D: 350 ^a	análisis heterodúplex ligeramente preferido sobre GeneScan (la variación de los tamaños de los productos dificulta el GeneScan)	3 - 3,5 h / 45 min
	Tubo E:	100-130	Tubo E: 211 ^b		

<i>IGK</i>	Tubo A: 120-160 (Vk1f/6/Vk7-Jk) + 190-210 (Vk3f-Jk) + 260-300 (Vk2f/Vk4/Vk5-JK) Tubo B: 210-250 Vk1f/6/Vk7-Kde + 270-300 (Vk3f/intrón-Kde) + 350-390 (Vk2f/Vk4/Vk5- Kde)	Tubo A: - Tubo B: ~404	Análisis heterodúplex ligeramente preferido sobre GeneScan (tamaño de unión pequeño + variación de los tamaños de los productos dificulta el GeneScan)	3 - 3,5 h / 45 min
<i>IGL</i>	Tubo A: 140-165	Tubo A: -	análisis heterodúplex claramente preferido sobre GeneScan (el tamaño de unión pequeño dificulta el GeneScan)	2 h / 45 min
<i>TCRB</i>	Tubo A: 240-285 Tubo B: 240-285 Tubo C: 170-210 (Dβ2) + 285-325 (Dβ1)	Tubo A: (273) ^c Tubo B: <150, 221 ^d Tubo C: 128, 337 ^d	análisis heterodúplex ligeramente preferido sobre GeneScan (repertorio limitado, en particular en el caso del uso de ψVγ10 y ψVγ11)	2 h / 45 min
<i>TCRG</i>	Tubo A: 145-255 Tubo B: 80-220	Tubo A: - Tubo B: -	análisis GeneScan y heterodúplex igualmente adecuados	2 h / 45 min
<i>TCRD</i>	Tubo A: 120-280	Tubo A: ~90	análisis heterodúplex claramente preferido sobre GeneScan (baja cantidad de molde + variación de los tamaños de los productos dificultan el GeneScan)	2 h / 45 min
<i>BCL1-IGH</i>	Tubo A: 150-2000	Tubo A: ~550 (débil)	agarosa	NA ^e
<i>BCL2-IGH</i>	Tubo A: variable Tubo B: variable Tubo C: variable	Tubo A: - Tubo B: - Tubo C: -	agarosa	NA ^e

a. La banda de 350 pb inespecífica es el resultado de la renaturalización cruzada del cebador D_H2 con una secuencia en la región de 5' de J_H4. En el análisis GeneScan esta banda inespecífica no co-migra con los productos D-J (véase la Figura 5B).

b. El producto de PCR de 211 pb representa la banda de fondo más pequeña derivada de la región D_H7-J_H1 de la línea germinal. Cuando la amplificación mediante PCR es muy eficaz, también se podrían obtener productos de PCR mayores debido a la renaturalización de los cebadores en los reordenamientos génicos J_H en 3'; p.ej. 419 pb (D_H7-J_H2), 1031 pb (D_H7-J_H3), etc.

c. La banda de 273 pb (principalmente visible mediante análisis GeneScan) se observa en particular en las muestras con un número bajo de células linfoides contaminantes.

d. La intensidad de la banda inespecífica depende de la calidad del cebador.

e. NA, no aplicable

REIVINDICACIONES

1. Un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *IGH* V_H-J_H que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores de la familia V_H mostrados en la Fig. 3B, y en el que dicho cebador inverso es el cebador consenso J_H mostrado en la Fig. 3B.
2. Un ensayo de amplificación de ácido nucleico, preferiblemente un ensayo de PCR, y más preferiblemente un ensayo de PCR multiplex, que usa al menos un grupo de cebadores según la reivindicación 1.
3. El ensayo de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 2, **caracterizado porque** es un ensayo de PCR.
4. El ensayo de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 2 o 3, **caracterizado porque** es un ensayo de PCR multiplex, que comprende además uno o más de los grupos de cebadores elegidos del grupo que consiste en:
 - a) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *IGH* D_H-J_H que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores de la familia D_H mostrados en la Fig. 4A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador consenso J_H mostrado en la Fig. 4A.
 - b) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *IGK* V_K-J_K que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores de la familia V_K mostrados en la Fig. 5B, y en el que dicho cebador inverso es un cebador J_K mostrado en la Fig. 5B.
 - c) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *IGK* V_K/intrón-Kde que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores V_K o del cebador INTR mostrados en la Fig. 5B, y en el que dicho cebador inverso es el cebador Kde mostrado en la Fig. 5B.
 - d) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *IGL* V_λ-J_λ que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores V_λ mostrados en la Fig. 6B, y en el que dicho cebador inverso es el cebador J_λ mostrado en la Fig. 6B.
 - e) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRB* V_β-J_β que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores de la familia V_β mostrados en la Fig. 7B, y en el que dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores J_{βA} y J_{βB} mostrados en la Fig. 7B.
 - f) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRB* D_β-J_β que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores D_β mostrados en la Fig. 7B, y en el que dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores J_{βA} y J_{βB} mostrados en la Fig. 7B.
 - g) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRG* V_γ-J_γ que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores de la familia V_γ mostrados en la Fig. 8B, y en el que dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores J_γ mostrados en la Fig. 8B.
 - h) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRD* V_δ-J_δ que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores V_δ mostrados en la Fig. 9B, y en el que dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores J_δ mostrados en la Fig. 9B.
 - i) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRD* D_δ-D_δ que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador D_{δ2} mostrado en la Fig. 9B, y en el que dicho cebador inverso es el cebador D_{δ3} mostrado en la Fig. 9B.
 - j) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRD* D_δ-J_δ que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador D_{δ2} mostrado en la Fig. 9B, y en el que dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores J_δ mostrados en la Fig. 9B.

- k) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar un reordenamiento de *TCRD Vδ-Dδ* que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores Vδ mostrados en la Fig. 9B, y en el que dicho cebador inverso es el cebador D83 mostrado en la Fig. 9B.
- 5 l) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar una translocación cromosómica (11;14)(*BCL1-IGH*) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador BCL1/MTC tal como se muestra en la Fig. 10A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador consenso JH mostrado en la Fig. 10A.
- 10 m) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar una translocación cromosómica t(14;18)(*BCL2-IGH*), que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo se selecciona de los cebadores MBR, los cebadores 3'MBR y los cebadores mcr mostrados en la Fig. 11A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador consenso JH mostrado en la Fig. 11A.
- 15 n) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar el gen *TBXAS1* humano que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador *TBXAS1/X9U* de la Fig. 12A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador *TBXAS 1/X9L* de la Fig. 12A.
- 20 o) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar el gen de la proteína activadora de la recombinación (*RAG1*) humana que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador *RAG1/X2U* de la Fig. 12A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador *RAG1/X2L* de la Fig. 12A.
- 25 p) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar la proteína con dedo de zinc de leucemia promielocítica (*PLZF*) humana que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador *PLZF/X1U* de la Fig. 12A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador *PLZF/X1L* de la Fig. 12A.
- 30 q) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar el gen *AF4* humano (Exón 3) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador *AF4/X3U* de la Fig. 12A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador *AF4/X3L* de la Fig. 12A.
- 35 r) un grupo de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar el gen *AF4* humano (Exón11) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que dicho cebador directo es el cebador *AF4/X11U* de la Fig. 12A, y en el que dicho cebador inverso es el cebador *AF4/X11L* de la Fig. 12A.
5. Un método para detectar un reordenamiento de *IGH V_H-J_H*, que comprende el uso de uno o más grupos de cebadores según la reivindicación 1 en un ensayo de amplificación de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2-4.
6. Un método para detectar dos o más reordenamientos, dos o más translocaciones o al menos un reordenamiento y al menos una translocación, en el que dicho reordenamiento al menos comprende un reordenamiento de *IGH V_H-J_H*, seleccionado del grupo que consiste en un reordenamiento de *IGH D_H-J_H*, un reordenamiento de *IGK V_K-J_K*, un reordenamiento de *IGK V_K/intrón-Kde*, un reordenamiento de *IGL V_λ-J_λ*, un reordenamiento de *TCRB Vβ-Jβ*, un reordenamiento de *TCRB Dβ-Jβ*, un reordenamiento de *TCRG Vγ-Jγ*, un reordenamiento de *TCRD Vδ-Jδ*, un reordenamiento de *TCRD Dδ-Jδ*, un reordenamiento de *TCRD Vδ-Dδ*, una translocación t(11;14)(*BCL1-IGH*) y una translocación t(14;18)(*BCL2-IGH*), mediante el uso de un ensayo de amplificación de ácido nucleico según la reivindicación 4.
- 45 7. Un método para estudiar reordenamientos clonales, que comprende al menos un reordenamiento de *IGH V_H-J_H*, y/o anomalías cromosómicas mediante el uso de al menos un grupo de cebadores según la reivindicación 1, y opcionalmente al menos un grupo de cebadores tal como se definieron en la reivindicación 4a-4r.
- 50 8. Un método según la reivindicación 7 para la detección de la enfermedad residual mínima (ERM) o para la identificación de objetivos de PCR a ser usados para la detección de la ERM por medio de PCR cuantitativa en tiempo real.
9. Un método según la reivindicación 7 o 8, en el que se detecta un ácido nucleico amplificado mediante el uso de un análisis de fragmentos de PCR de alta resolución automatizado.
- 55 10. Un equipo para la detección de al menos un reordenamiento de *IGH V_H-J_H* y opcionalmente un reordenamiento seleccionado del grupo que consiste en un reordenamiento de *IGH D_H-J_H*, un reordenamiento de *IGK V_K-J_K*, un reordenamiento de *IGK V_K/intrón-Kde*, un reordenamiento de *IGL V_λ-J_λ*, un reordenamiento de *TCRB Vβ-Jβ*, un reordenamiento de *TCRB Dβ-Jβ*, un reordenamiento de

5 *TCRG* V γ -J γ , un reordenamiento de *TCRD* V δ -J δ , un reordenamiento de *TCRD* D δ -D δ , un reordenamiento de *TCRD* D δ -J δ , un reordenamiento de *TCRD* V δ -D δ , y una translocación seleccionada de t(11;14)(*BCL1-IGH*) y t(14;18)(*BCL2-IGH*), que comprende el uso de al menos un grupo de cebadores según la reivindicación 1, y opcionalmente al menos un grupo de cebadores tal como se definieron en la reivindicación 4a-4m.

11. Un equipo según la reivindicación 10, que comprende además al menos un grupo de cebadores tal como se definieron en la reivindicación 4o-4r.

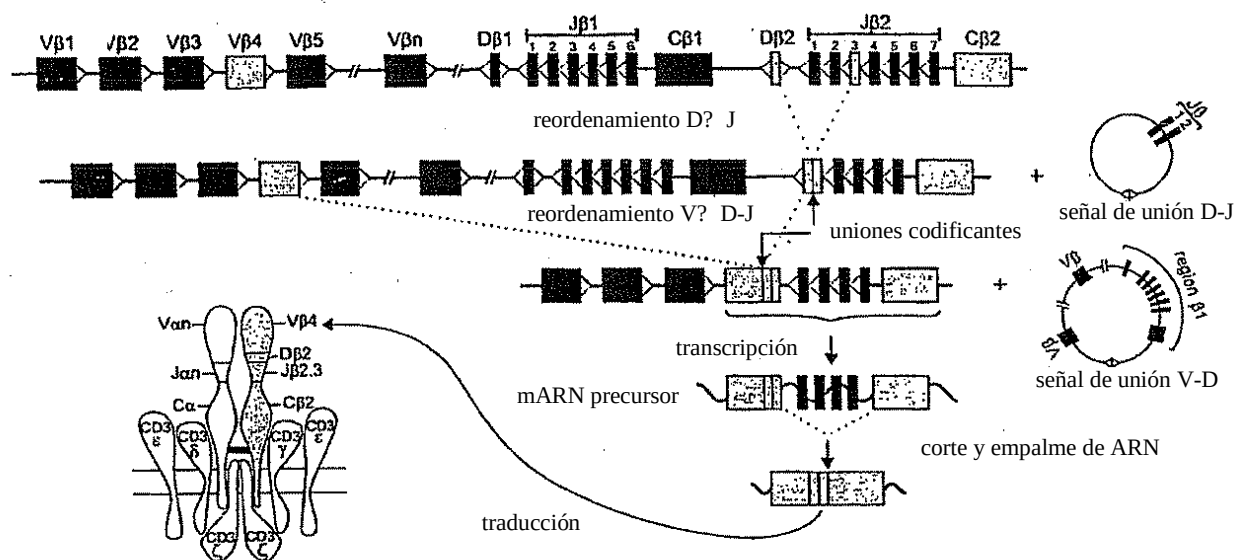
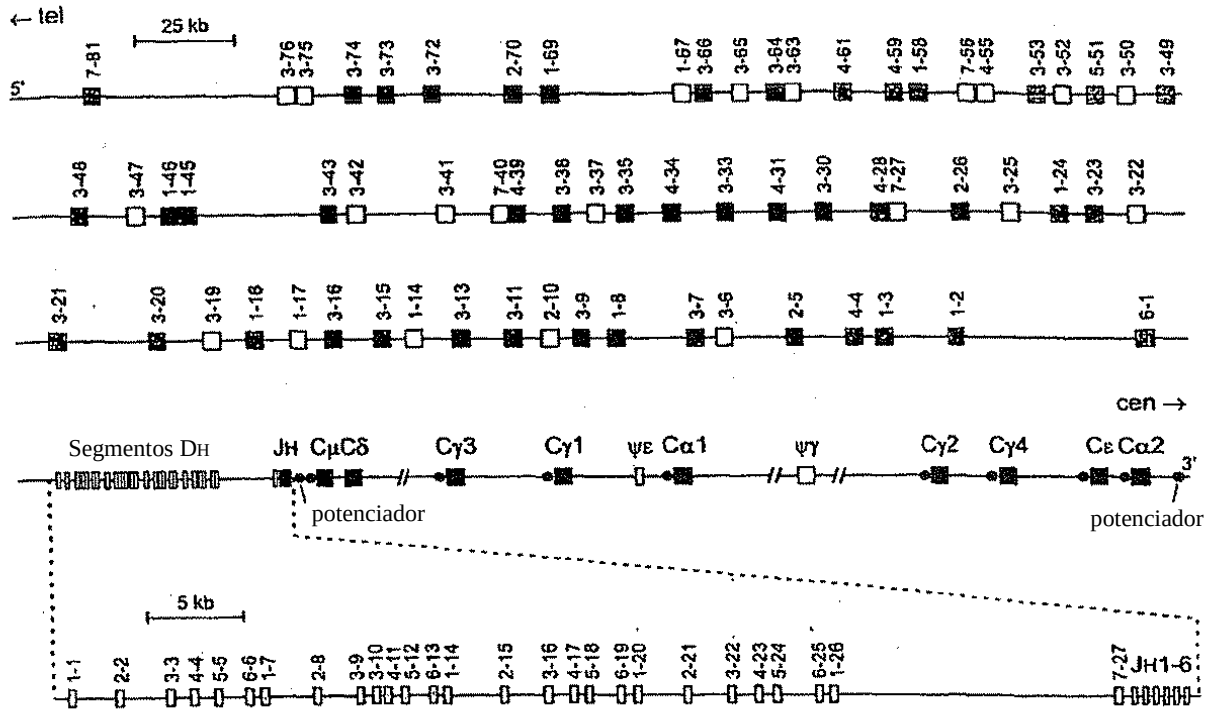
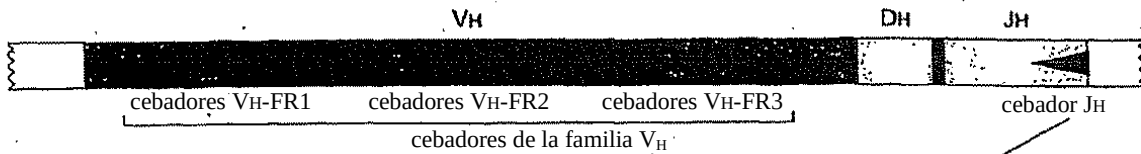


Figura 1

A. Complejo del gen *IGH* (#14q32.3)

B

Tubo A de *IGH*

VH1-FR1 (1-2) (-252) GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
 VH2-FR1 (2-5) (-284) GTCTGGTCTACGCTGGTGAAACCC
 VH3-FR1 (3-7) (-256) CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
 VH4-FR1 (4-4) (-256) CTTGGGAGACCCTGTCCCTCACCTG
 VH5-FR1 (5-51) (-255) CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
 VH6-FR1 (6-1) (-263) TCGCAGACCCTCTCACTCAGCTGTG

Tubo B de *IGH*

VH1-FR2 (1-2) (-192) CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
 VH2-FR2 (2-5) (-190) TGGATCCGTAGCCCCAGGGAAGG
 VH3-FR2 (3-7) (-189) GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
 VH4-FR2 (4-4) (-188) TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
 VH5-FR2 (5-51) (-190) GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGG
 VH6-FR2 (6-1) (-194) TGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAG
 VH7-FR2 (7) (-192) TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA

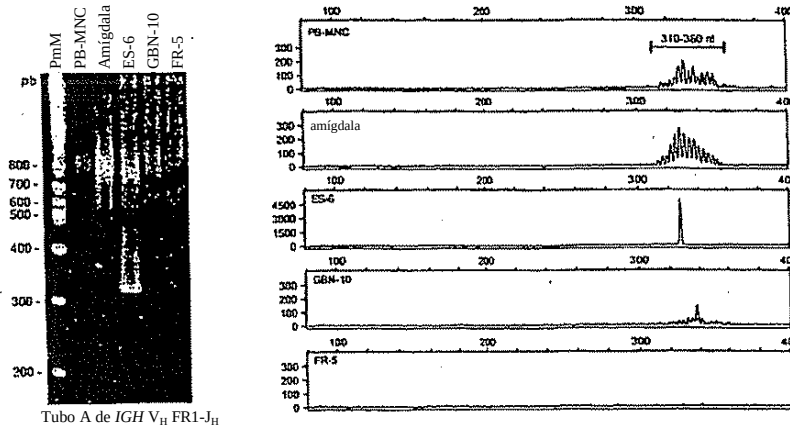
Tubo C de *IGH*

VH1-FR3 (1-2) (-55) TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
 VH2-FR3 (2-5) (-54) CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA
 VH3-FR3 (3-7) (-57) TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
 VH4-FR3 (4-4) (-48) GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAG
 VH5-FR3 (5-51) (-69) CAGCACCCTACCTGCAGTGGAGC
 VH6-FR3 (6-1) (-63) GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG
 VH7-FR3 (7) (-69) CAGCAGGGCATATCTGCAGATCAG

3' CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC 5' Tubos A, B y C de *IGH*
 (+57) JH consenso

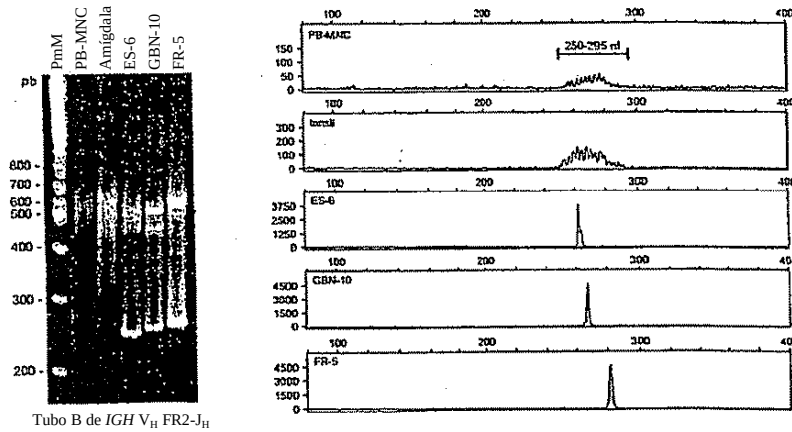
Figura 3 (A y B)

C. Tubo A de *IGH* V_H FR1-J_H



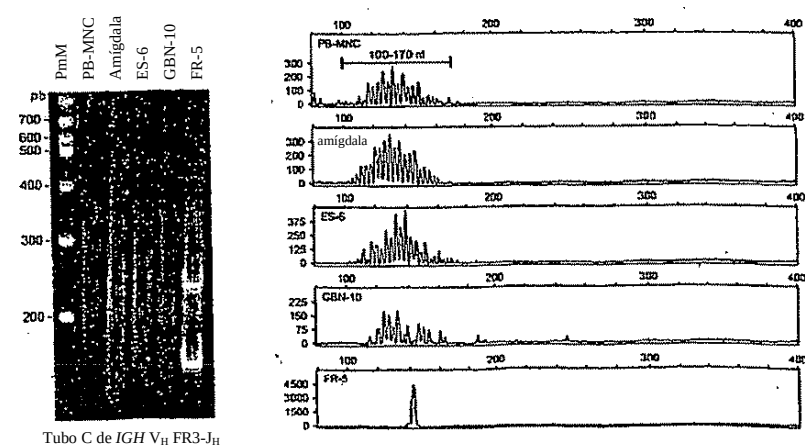
Tubo A de *IGH* V_H FR1-J_H

D. Tubo B de *IGH* V_H FR2-J_H



Tubo B de *IGH* V_H FR2-J_H

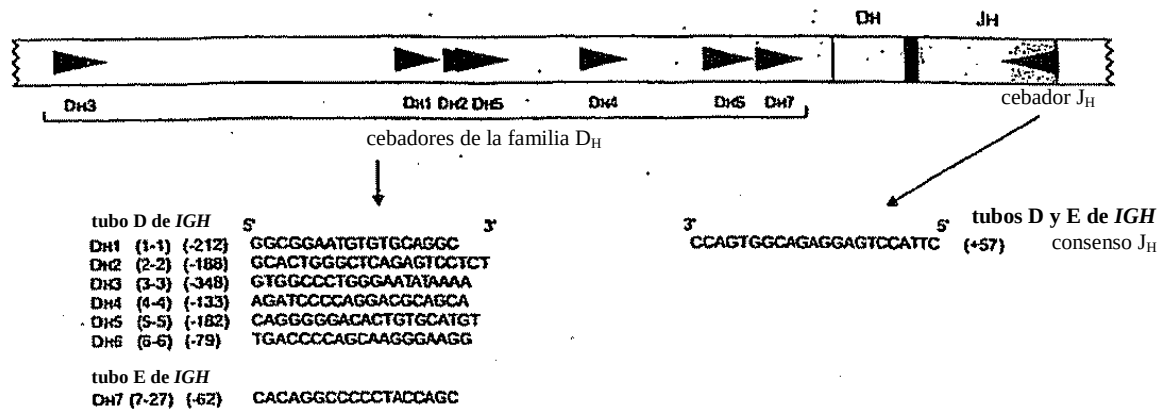
E. Tubo C de *IGH* V_H FR3-J_H



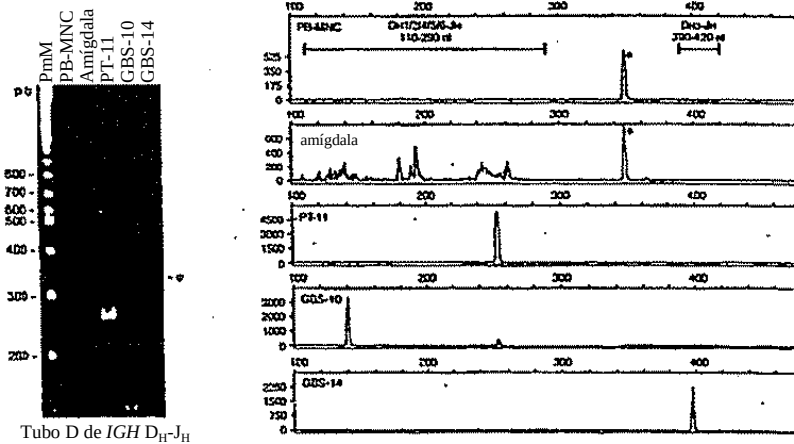
Tubo C de *IGH* V_H FR3-J_H

Figura 3 (C, D y E)

A



B. Tubo D de IGH D_H-J_H



C. Tubo E de IGH D_H7-J_H

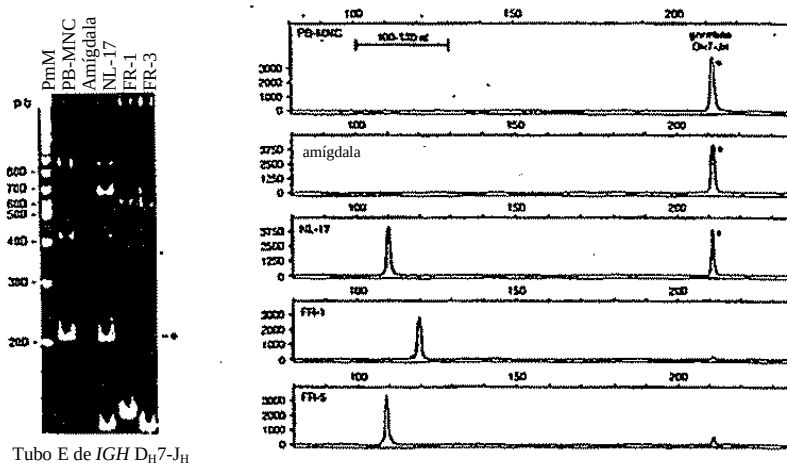
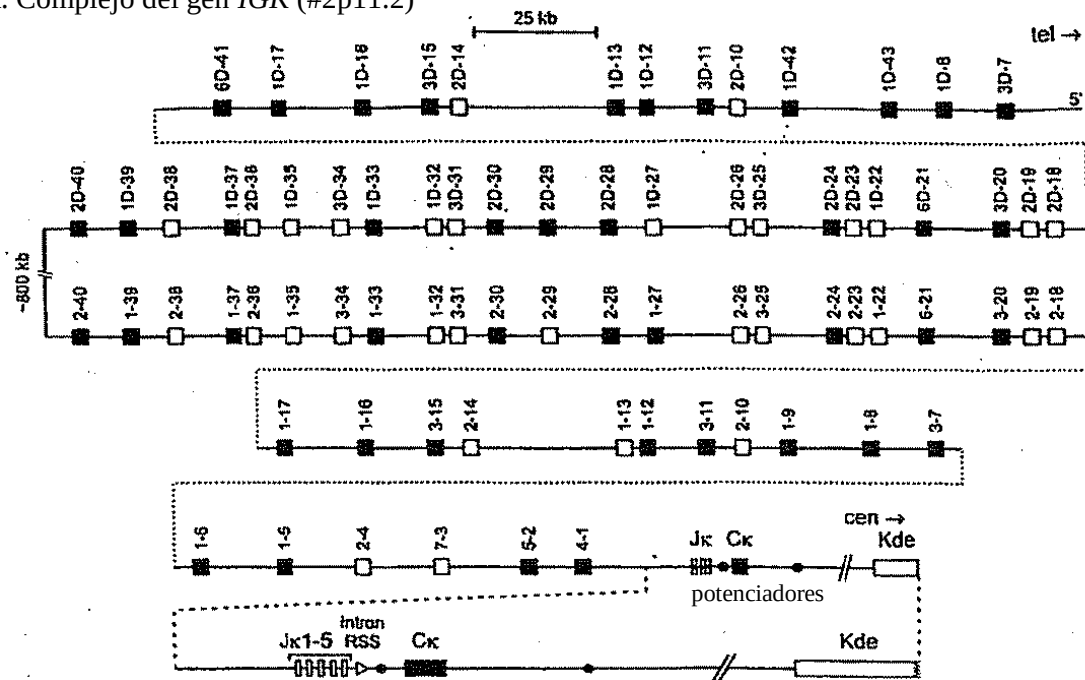


Figura 4 (A, B y C)

A. Complejo del gen *IGK* (#2p11.2)



B

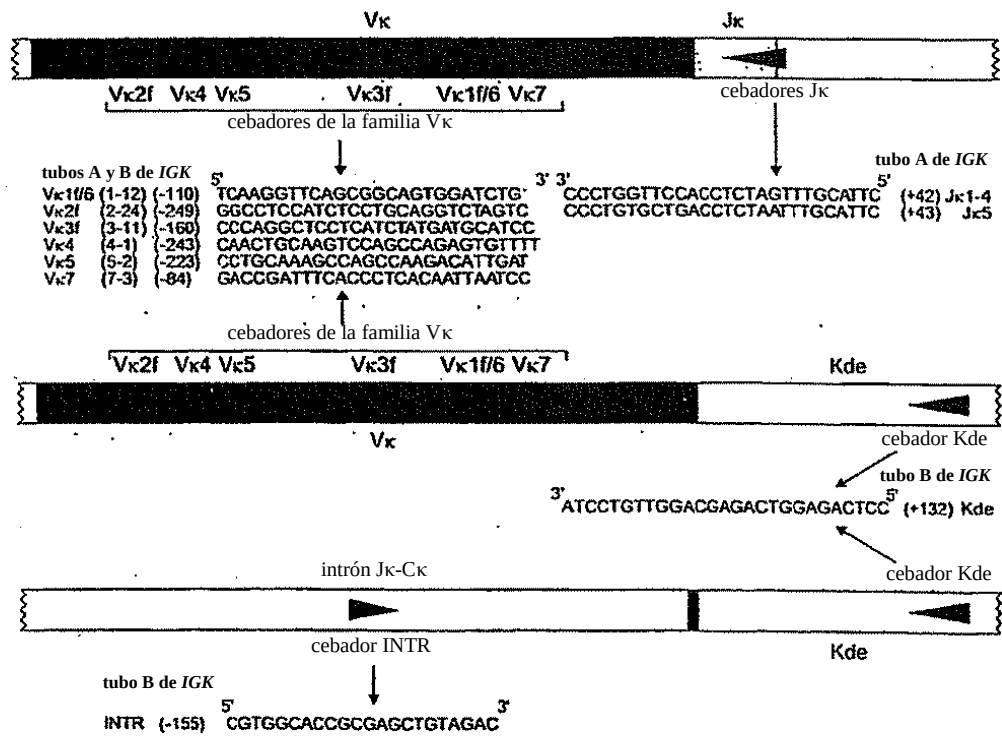
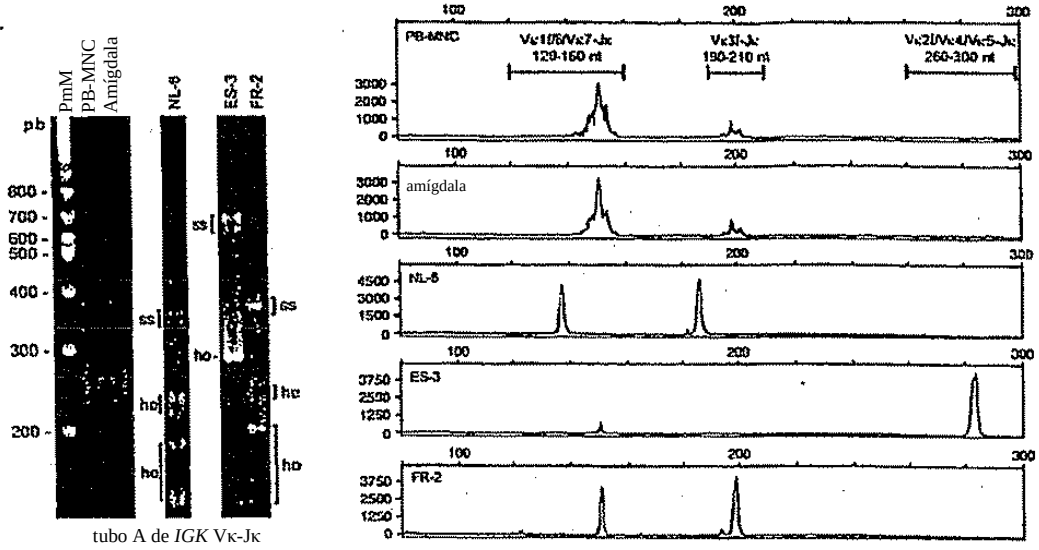


Figura 5 (A y B)

C. Tubo A de *IGK V κ -J κ*



D. Tubo B de *IGK V κ /intrón-Kde*

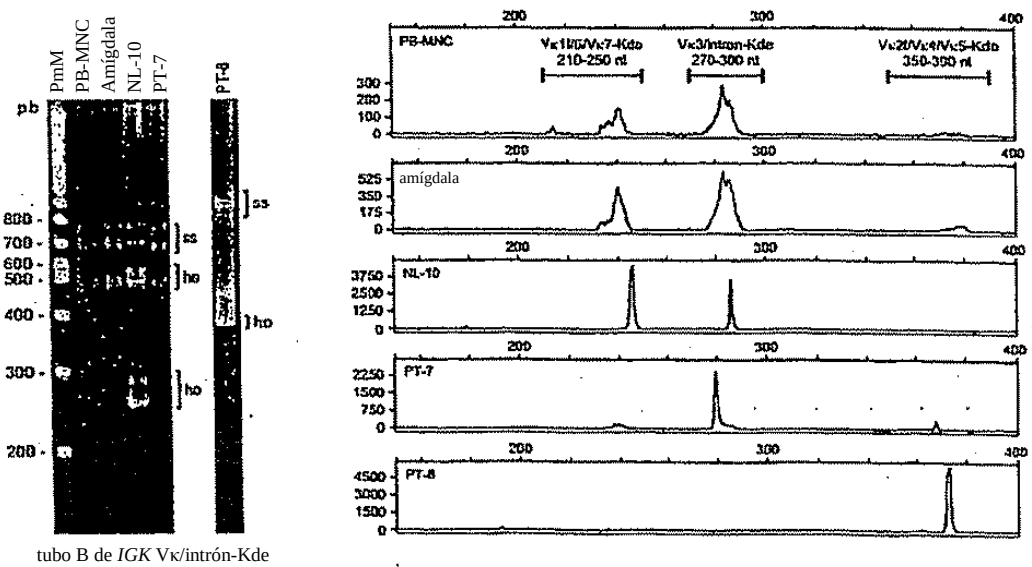
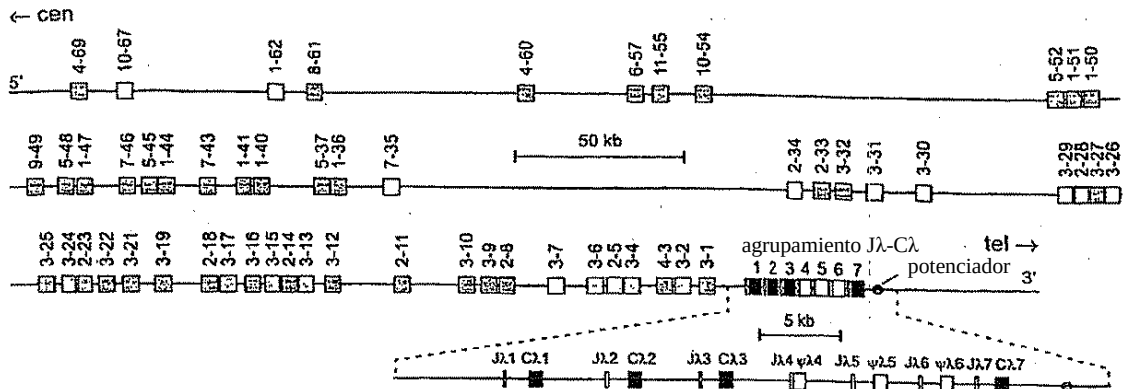
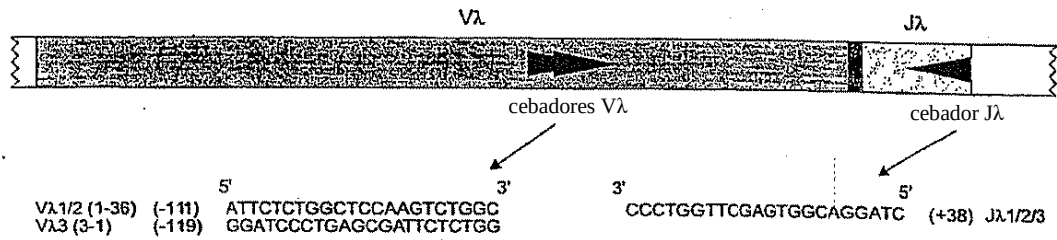


Figura 5 (C y D)

A. Complejo del gen *IGL* (#22q11.2)



B



C. Tubo de *IGL* Vλ-Jλ

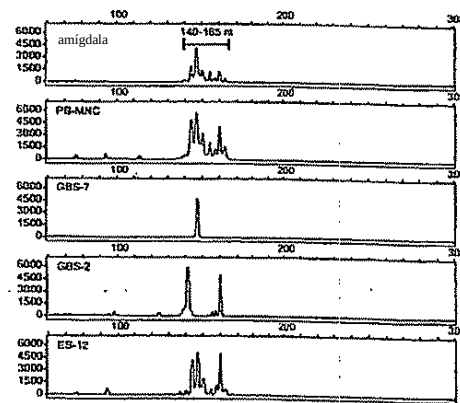
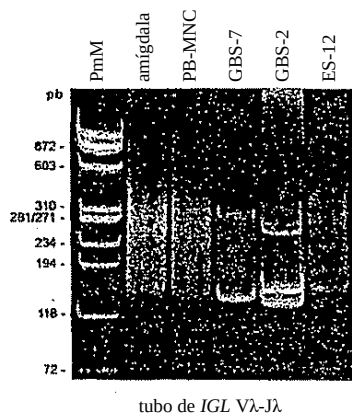


Figura 6 (A, B y C)

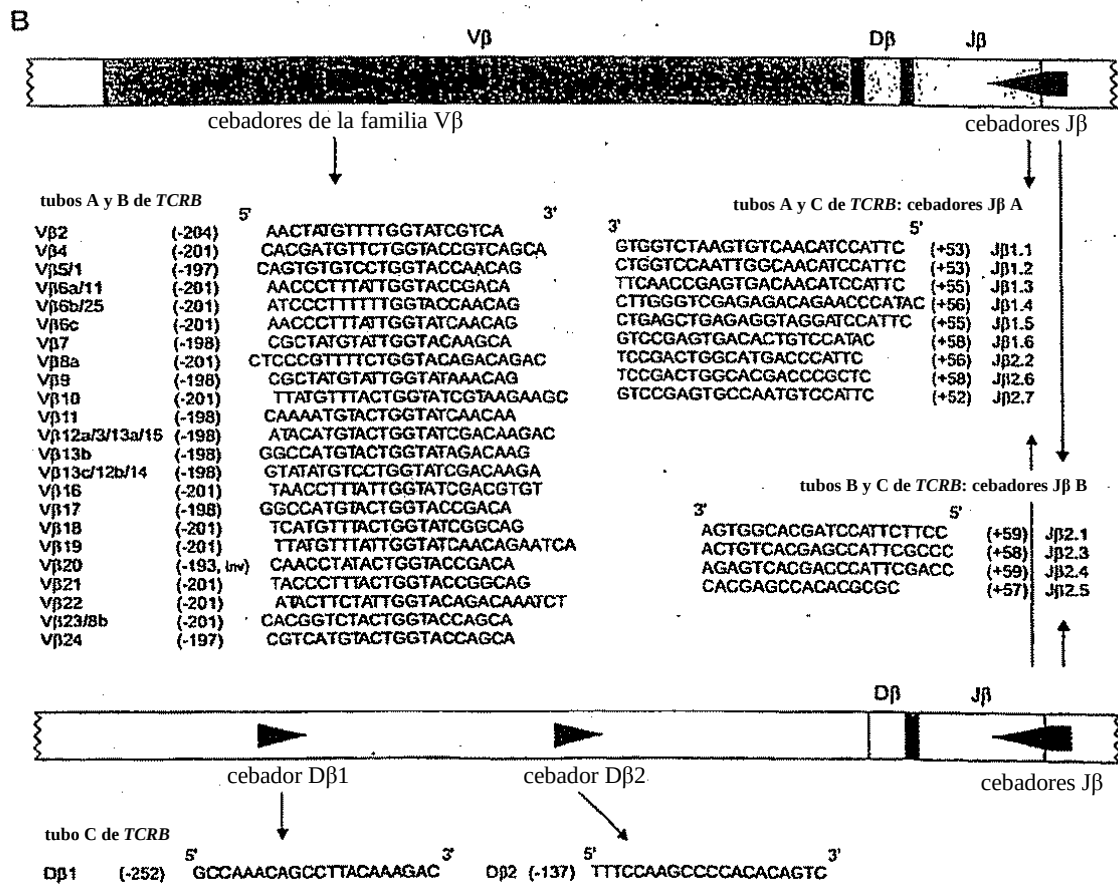
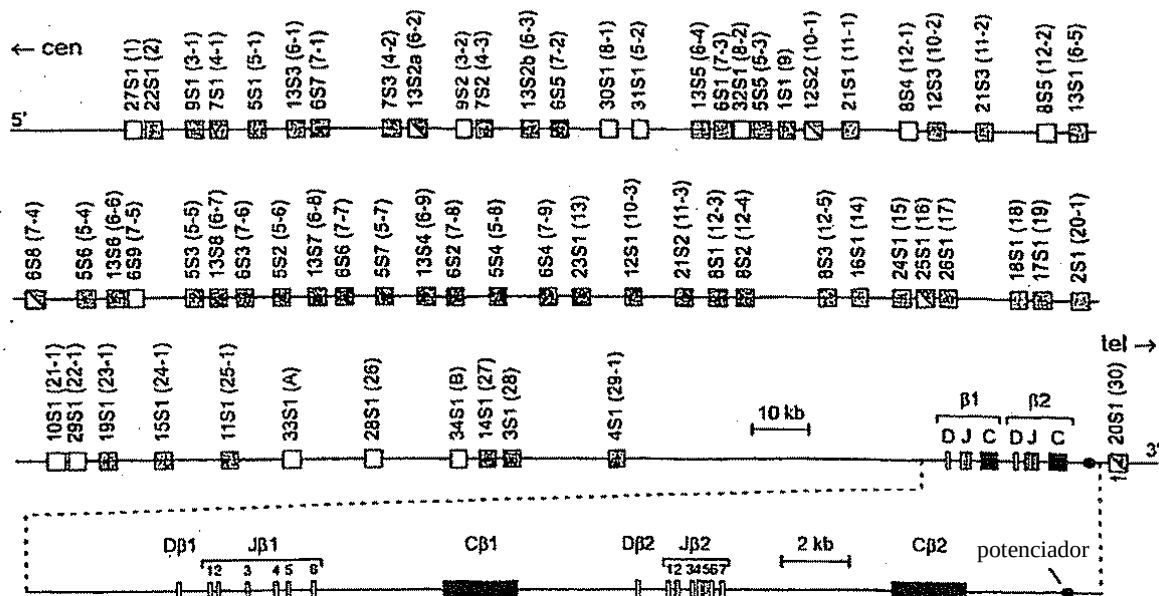
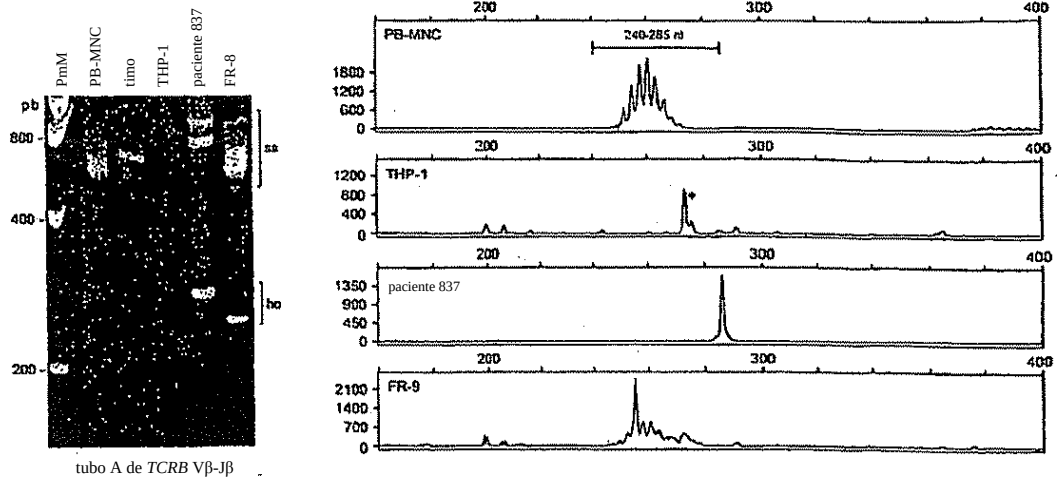
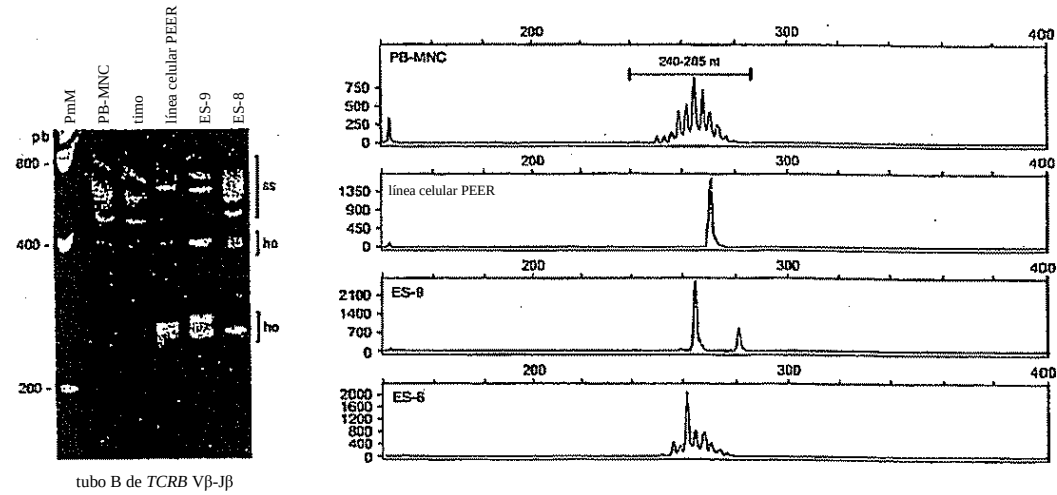
A. Complejo del gen *TCRB* (#7q34)

Figura 7 (A y B)

C. Tubo A de *TCRB* V β -J β



D. Tubo B de *TCRB* V β -J β



E. Tubo C de *TCRB* D β -J β

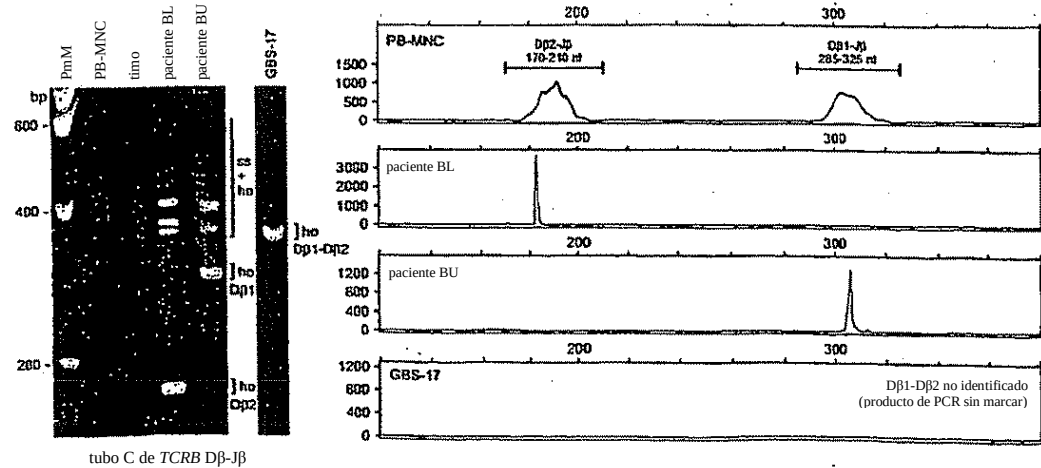
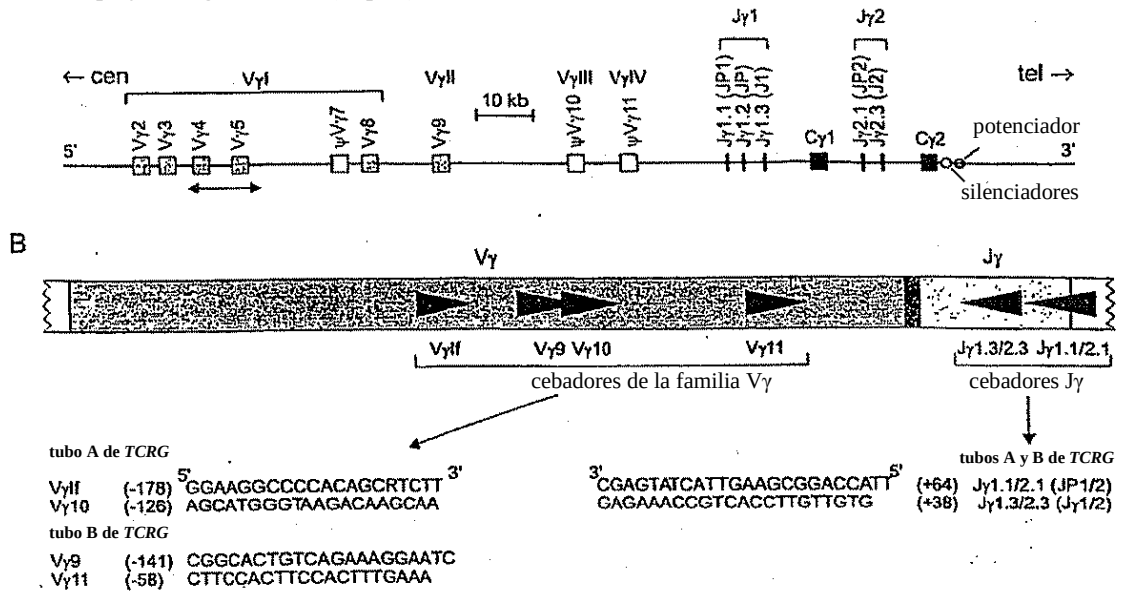
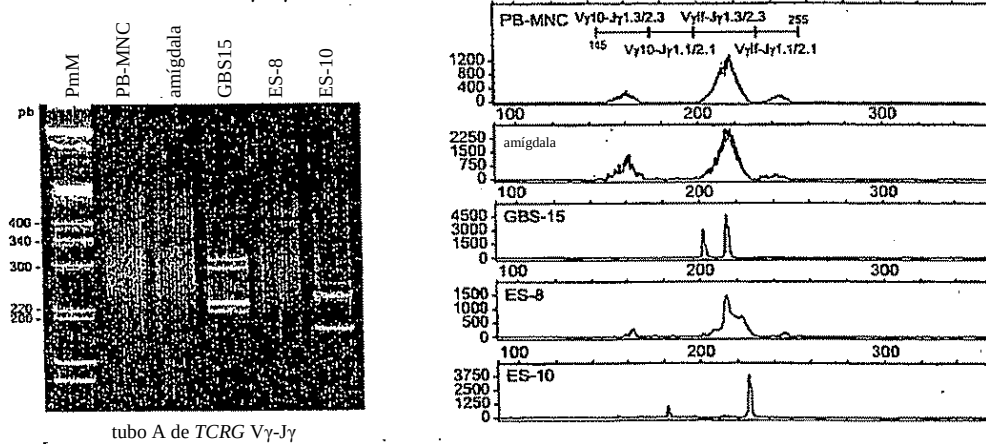


Figura 7 (C, D y E)

A. Complejo del gen *TCRG* (#7p14)



C. Tubo A de *TCRG* *Vγ-Jγ*



D. Tubo B de *TCRG* *Vγ-Jγ*

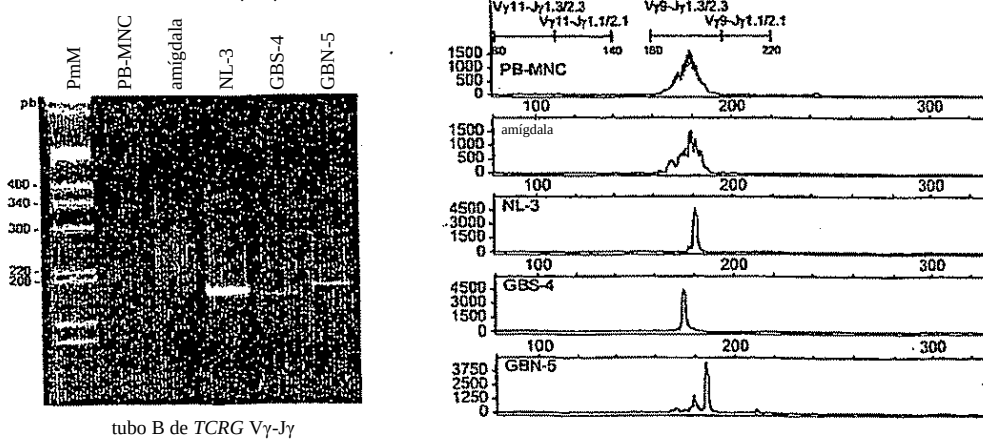
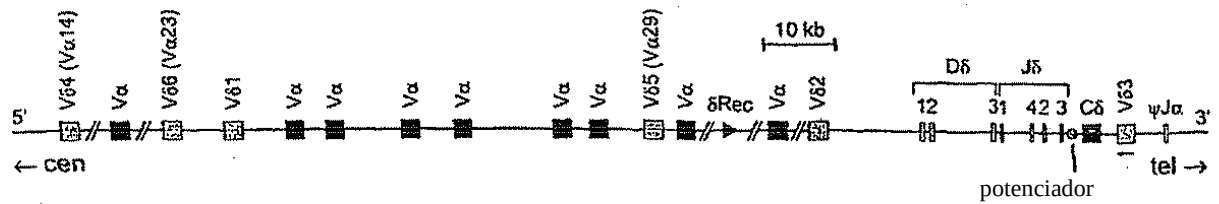
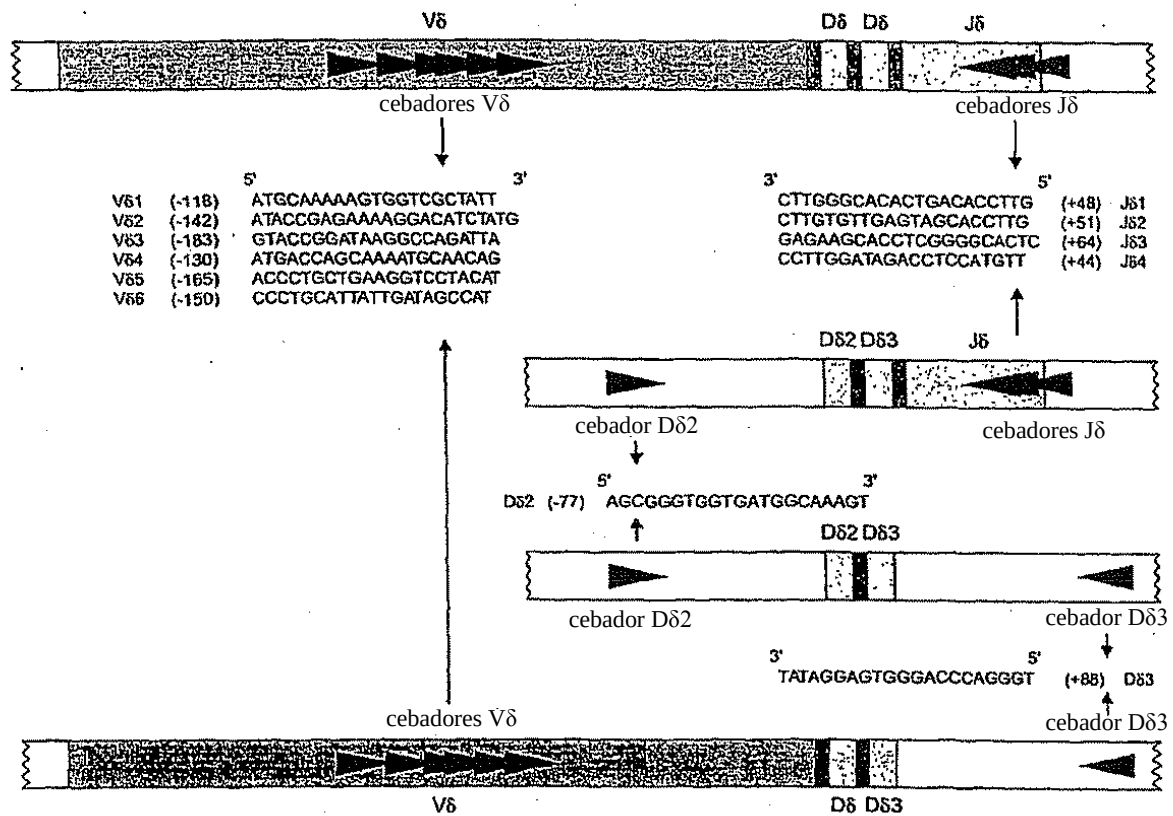


Figura 8 (A, B, C y D)

A. Complejo del gen *TCRD* (#14q11.2)



B



C. Tubo de *TCRD* V δ -J δ /D δ -D δ /D δ -J δ

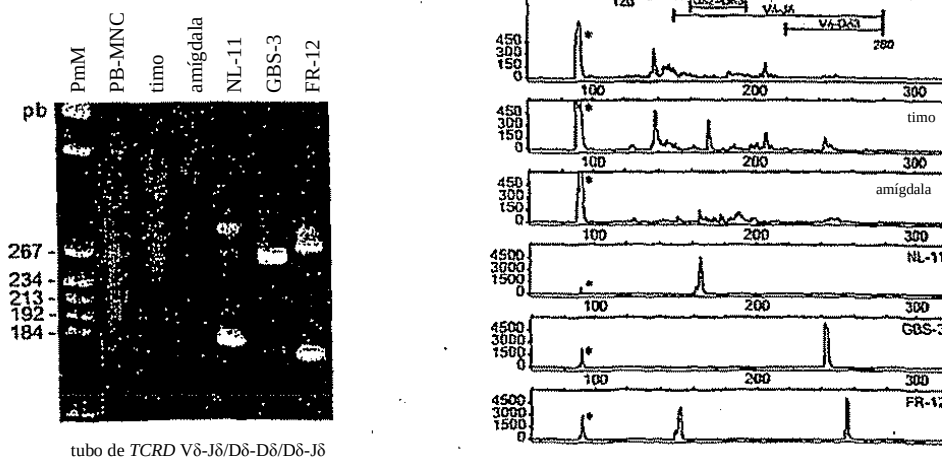


Figura 9 (A, B, y C)

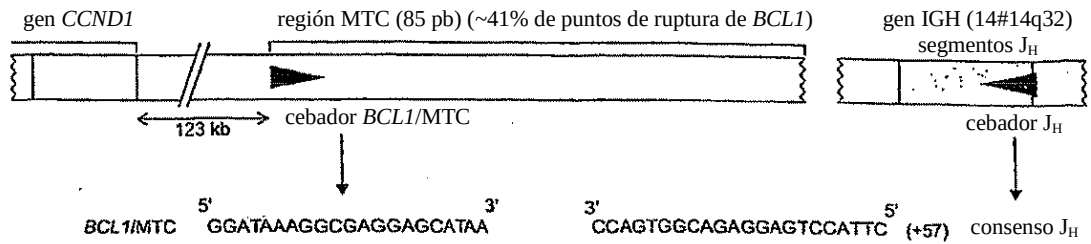
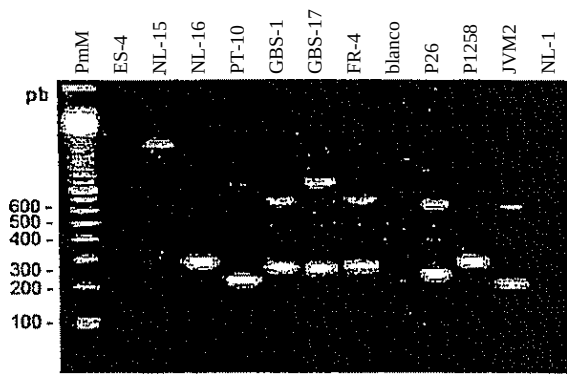
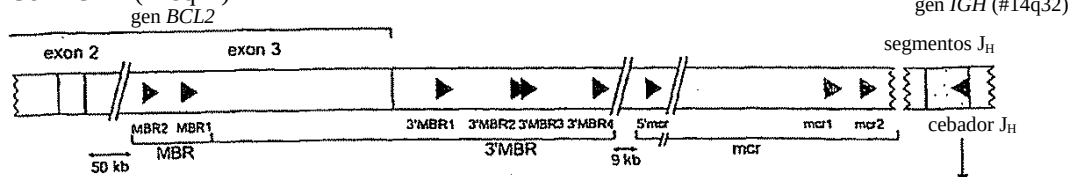
A. Locus de *BCL1* (#11q13)B. Tubo de t(11;14) de *BCL1* MTC-J_Htubo de t(11;14) de *BCL1* MTC-J_H

Figura 10 (A y B)

A. Gen *BCL-2* (#18q21)



tubo A de t(14;18): cebadores de MBR

MBR1	(-3072)	5'	GACCAGCAGATTCAAATCTATGG	3'	CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC	5'	tubos A, B y C de t(14;18)
MBR2	(-3575)		ACTCTGTGGCATTATGCAATTAT			(+57)	consenso J_H

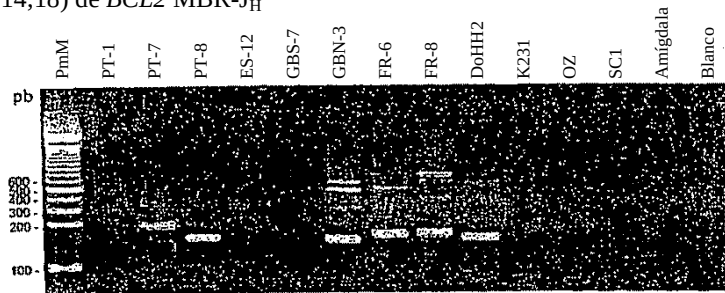
tubo B de t(14;18): cebadores de 3'MBR

3'MBR1	(+549)	GCACCTGCTGGATACAACACTG
3'MBR2	(+1224)	AAACTAGCAGGGTGTGGTGGC (sust. por +1362; GGTGACAGAGCAAAACATGAACA)
3'MBR3	(+1619)	GTAATGACTGGGGAGCAATCTT
3'MBR4	(+2550)	ACTGGTTGGCGTGGTTAGAGA

tubo C de t(14;18): cebadores de mcr

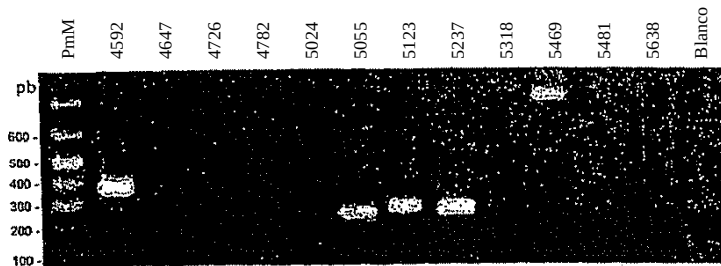
5'mcr	(+15681)	CCTTCTGAAAGAAACGAAAGCA
mcr1	(+1961)	TAGAGCAAGCGCCCAATAATA
mcr2	(+2407)	TGAATGCCATCTCAAATCCAA

B. Tubo A de t(14;18) de *BCL2* MBR- J_H



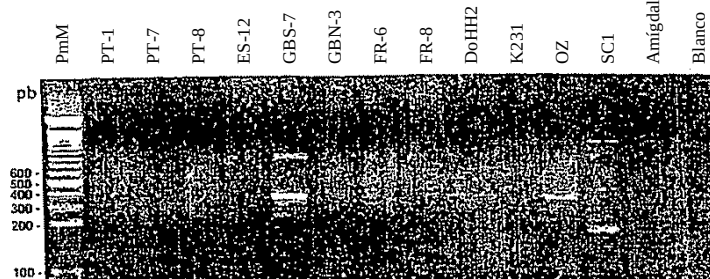
tubo A de t(14;18) de *BCL2* MBR- J_H

C. Tubo B de t(14;18) de *BCL2* 3'MBR- J_H



tubo B de t(14;18) de *BCL2* 3'MBR- J_H

D. Tubo C de t(14;18) de *BCL2* mcr- J_H



tubo C de t(14;18) de *BCL2* mcr- J_H

Figura 11 (A, B, C y D)

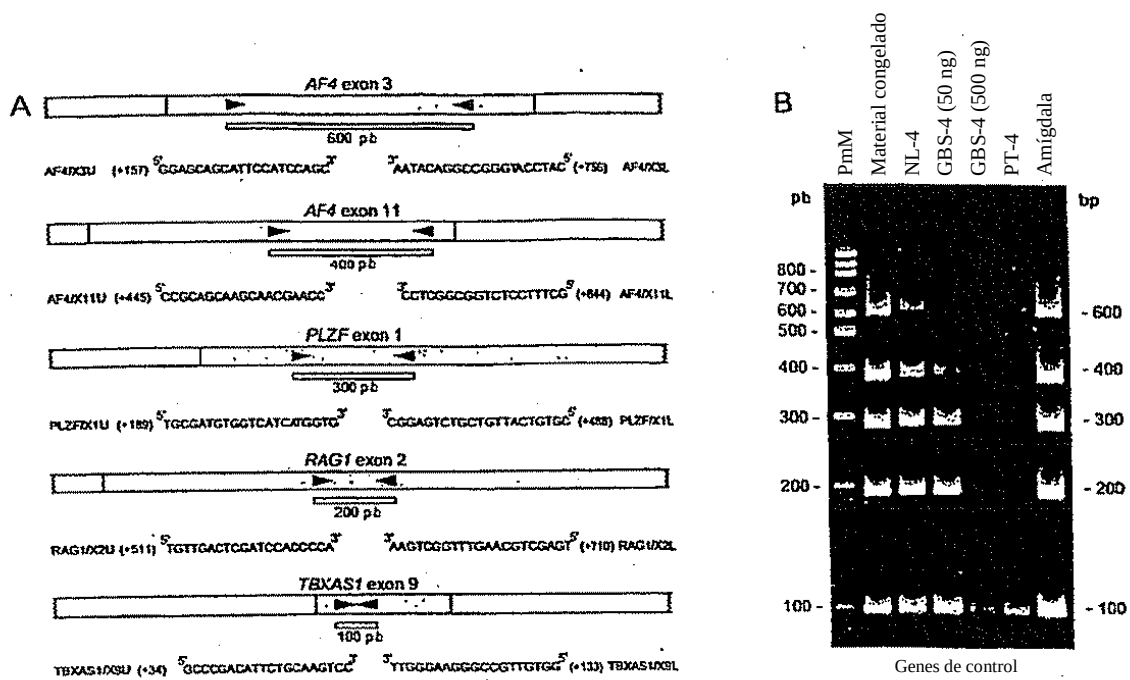
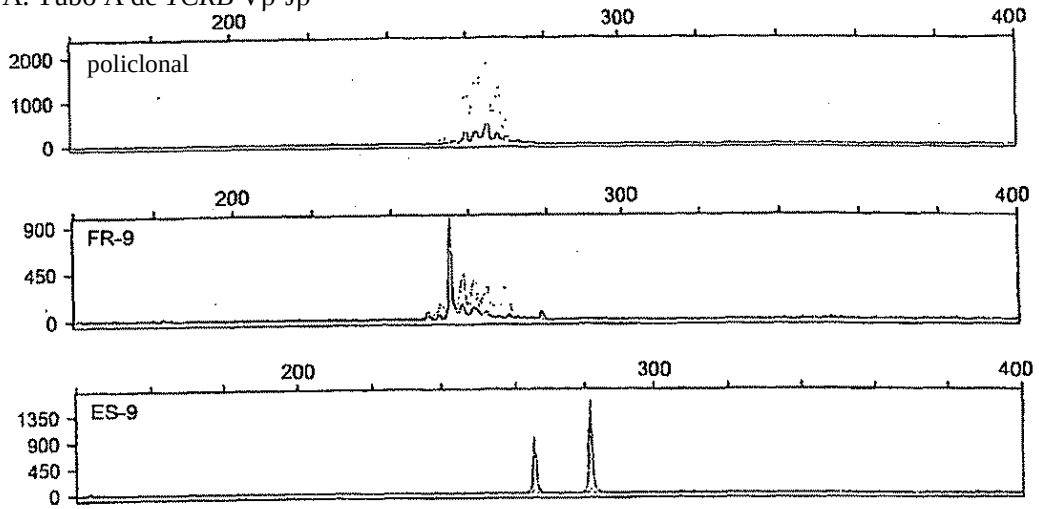
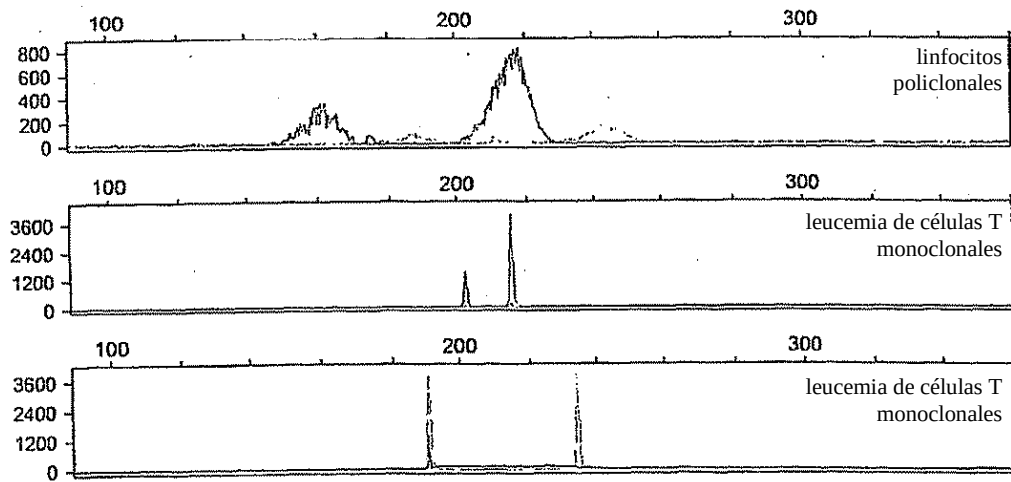


Figura 12 (A y B)

A. Tubo A de *TCRB* V β -J β



B. Tubo A de *TCRG* V γ -J γ



C. Tubo de *TCRD* V δ -J δ /D δ -D δ /D δ -J δ

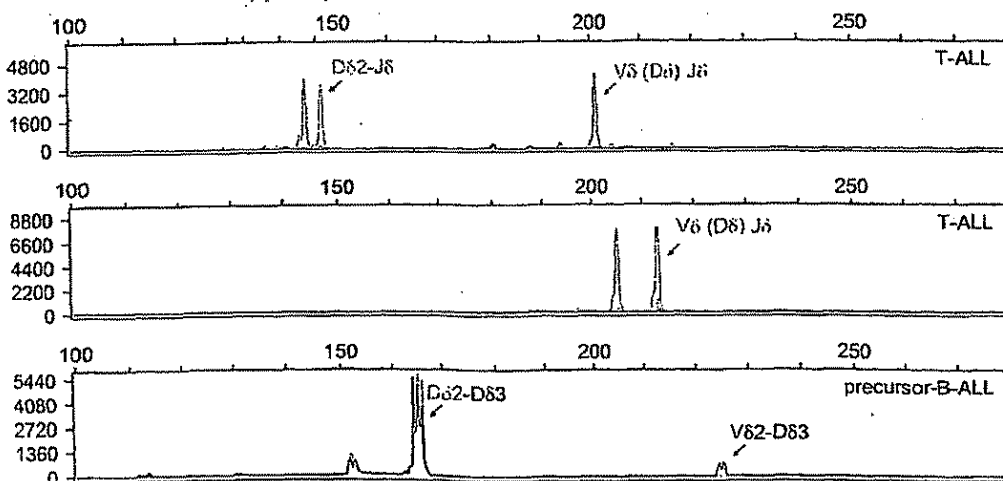


Figura 13 (A, B y C)