

Caracterización del perfil de reordenamientos génicos de inmunoglobulinas y receptores de linfocitos T en leucemia linfoblástica aguda pediátrica

► Patricia Rubio^{1a*}, Jorge Digiorge^{2a}, Jorge Rossi^{3b}, Yamila Pagliardi^{4a}, Myriam Gutter^{5c}, María Sara Felice^{6c}, Cristina Noemí Alonso^{7d}

¹ Bioquímica, Magíster en Biología Molecular, Médica de la Universidad de Buenos Aires.

² Bioquímico.

³ Bioquímico, Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

⁴ Técnica de Laboratorio.

⁵ Médica Pediatra.

⁶ Médica Pediatra, Doctora de la Universidad de Buenos Aires.

⁷ Bioquímica, Doctora de la Universidad de Buenos Aires.

^a Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Servicio de Hematología y Oncología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan".

^b Laboratorio de Inmunología Celular del Servicio de Reumatología e Inmunología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan".

^c Servicio de Hematología y Oncología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan".

^d Laboratorio de Genómica. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan".

* Autora para correspondencia.

Resumen

Durante la ontogenia linfocitaria se produce el reordenamiento de los segmentos génicos V-(D)-J que codifican para la región variable de las cadenas de inmunoglobulinas (Ig) y receptores de linfocitos T (TCR). Durante este proceso, los segmentos se reordenan al azar y ocurren deleciones e inserciones de nucleótidos en la región de unión entre ellos. Los objetivos del presente trabajo fueron describir las incidencias de los reordenamientos Ig/TCR y de los segmentos V-(D)-J involucrados, en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Para ello se estudiaron 769 pacientes pediátricos con LLA, diagnosticados entre 1999 y 2018 por los centros de la Sociedad Argentina de Hemato-Oncología Pediátrica. Se caracterizaron reordenamientos de Ig/TCR mediante PCR-*multiplex* y secuenciación para la búsqueda de recombinaciones génicas *IGH*, *IGK*, *TCRB*, *TCRG* y *TCRD*, en muestras de ADN obtenidas de médula ósea o sangre periférica al diagnóstico. El 95% (n=730) de los casos presentaron reordenamientos Ig/TCR. En el 68% de los casos se caracterizaron recombinaciones génicas *IGH*, en 43% *IGK*, en 25% *TCRB*, en 49% *TCRG* y en el 55% *TCRD*. Se caracterizó un total de 2506 reordenamientos de Ig/TCR que correspondían 1161 a inmunoglobulinas y 1345 a TCR. En la mayoría de los casos los reordenamientos de *IGH* fueron completos, *IGK* involucró a *IGKde*, *TRCB* se reordenó frecuentemente con el segmento *Jb2*, *TCRG* involucró preferentemente a *Vg9* y los *TCRD* fueron principalmente reordenamientos incompletos. Este trabajo constituye el primer estudio realizado en la Argentina sobre la caracterización de reordenamientos Ig/TCR en un número muy significativo de pacientes con LLA pediátrica.

Palabras clave: Reordenamientos Ig/TCR; Inmunoglobulinas; Receptor de células T; Leucemia linfoblástica aguda; Clonalidad; Pediatría

Pattern of immunoglobulins and T lymphocyte receptor gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia

Abstract

During lymphocyte ontogeny, the variable region of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) is generated by rearrangements of the V-(D)-J gene segments. In this random process, nucleotide deletions and insertions occur be-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

tween V-(D)-J segments. The aims of this work were to describe the incidence of Ig/TCR rearrangements, and the V-(D)-J segments involved in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. With this purpose, 769 pediatric ALL patients belonging to Sociedad Argentina de Hemato-Oncología Pediátrica, diagnosed between 1999 and 2018, were studied. Ig/TCR rearrangements were characterized by multiplex PCR and sequencing to evaluate IGH, IGK, TCRB, TCRG and TCRD rearrangements in DNA samples obtained at diagnosis from bone marrow or peripheral blood. In total, 95% (n=730) of patients disclosed Ig/TCR rearrangements. IGH rearrangements were detected in 68% of cases; in 43% IGK, in 25% TCRB, in 49% TCRG and in 55% of cases, TCRD. A total of 2506 Ig/TCR rearrangements were characterized, being 1161 immunoglobulins and 1345 TCR. In most cases, IGH rearrangements were complete, IGK involved IGKde, TCRB was frequently rearranged with the Jb2 segment, TCRG preferentially involved Vg9, and TCRDs were mostly incomplete rearrangements. This work is the first study of Ig/TCR rearrangements characterization in a very significant number of childhood ALL carried out in Argentina.

Keywords: Ig/TCR rearrangements; Immunoglobulins; T cell receptor; Acute lymphoblastic leukemia; Clonality; Pediatrics

Caracterização do perfil de rearranjos gênicos de imunoglobulinas e receptores de linfócitos T na leucemia linfóide aguda pediátrica

Resumo

Durante a ontogenia dos linfócitos, ocorre um rearranjo dos segmentos gênicos V-(D)-J que codificam para a região variável das cadeias de imunoglobulinas (Ig) e receptores de linfócitos T (TCR). Durante esse processo, os segmentos reorganizam-se aleatoriamente e exclusões e inserções de nucleotídeos ocorrem na região da união entre eles. Os objetivos do presente trabalho foram descrever as incidências dos rearranjos Ig/TCR e dos segmentos V-(D)-J envolvidos, em crianças com leucemia linfóide aguda (LLA). Para tanto, foram estudados 769 pacientes pediátricos com LLA, diagnosticados entre 1999 e 2018 pelos centros da Sociedade Argentina de Hemato-Oncologia Pediátrica. Rearranjos de Ig/TCR foram caracterizados através de PCR-multiplex e sequenciação para procurar recombinações gênicas IGH, IGK, TCRB, TCRG e TCRD em amostras de DNA obtidas da medula óssea ou sangue periférico no diagnóstico. Do total de pacientes estudados, 95% (n=730) apresentaram rearranjos de Ig/TCR. Os rearranjos gênicos IGH foram caracterizados em 68% dos casos, em 43% de IGK, em 25% de TCRB, em 49% de TCRG e em 55% de TCRD. Foi caracterizado um total de 2506 rearranjos de Ig/TCR, correspondendo 1161 a imunoglobulinas e 1345 a TCR. Na maioria dos casos, os rearranjos de IGH foram concluídos, o IGK envolveu o IGKde, o TCRB foi frequentemente rearranjado com o segmento Jb2, o TCRG preferencialmente envolveu o Vg9 e os TCRDs foram principalmente os rearranjos incompletos. Este trabalho constitui o primeiro estudo realizado na Argentina sobre a caracterização de rearranjos de Ig/TCR em um número muito significativo de pacientes com LLA pediátrica.

Palavras-chave: Rearranjos de Ig/TCR; Imunoglobulinas; Receptor de células T; Leucemia linfóide aguda; Clonalidade; Pediatria

Introducción

La linfopoyesis resulta en la producción continua de linfocitos B y linfocitos T maduros, los cuales forman parte del sistema inmune. Ambos tipos de linfocitos expresan receptores únicos en la membrana celular que permiten el reconocimiento antigénico y su capacidad de reconocer específicamente a los antígenos se basa en la enorme diversidad de receptores (1).

Las moléculas de inmunoglobulinas (Ig) consisten en dos cadenas pesadas (IGH) y dos cadenas livianas (IGK o IGL) unidas por enlaces disulfuro, las cuales están compuestas de un dominio variable, que participa en el reconocimiento de antígenos, y un dominio constante. El dominio variable de una cadena pesada de inmunoglobulina está codificado por una recombi-

nación de un segmento génico V (variable), D (diversidad) y J (*joining*, unión) mientras que en las cadenas livianas el dominio variable resulta de la recombinación de segmentos V y J (2).

Los precursores de linfocitos B comienzan reordenando en primer lugar el *locus* IGH con un ensamble inicial de la región variable de segmentos Dh-Jh, seguido del acoplamiento de Vh a la recombinación Dh-Jh. La recombinación de los genes de las cadenas livianas *Kappa* precede a la de las cadenas livianas *Lambda*, comenzando con el reordenamiento de Vk con Jk. La cadena *Lambda* sólo se reordena si las cadenas IGK no logran reorganizar sus genes de forma productiva. Para que un reordenamiento de IGL ocurra, prácticamente todo el segmento génico IGK debe ser deletado. Este proceso de delección sucede a través del elemento de eliminación

denominado *Kappa deleting element* (Kde), el cual se reordena con segmentos del gen Vk o con una secuencia de señal de recombinación (SSR) en el intrón entre los segmentos Jk y el segmento constante Ck, originando los reordenamientos no funcionales Vk-Kde e Intrón-Kde, respectivamente (3). Estos reordenamientos originados son terminales, es decir que no poseen capacidad de continuar recombinándose.

Las moléculas del receptor de linfocitos T (TCR) están formadas por dos cadenas unidas por puentes disulfuro. Se han reconocido dos tipos de TCR: el TCR $\alpha\beta$ y el TCR $\gamma\delta$. De forma similar a las cadenas de inmunoglobulinas, cada cadena de TCR consta de dos dominios: un dominio variable y un dominio constante donde el dominio variable de las cadenas del TCRA y TCRG está codificado por una recombinación de los segmentos génicos V y J; mientras que en el caso de cadenas TCRB y TCRD, el dominio variable resulta de una recombinación de los segmentos génicos V, D y J (1).

El reordenamiento al azar de los segmentos V, (D) y J que codifican para las regiones variables de las cadenas de Ig y TCR es mediado por un complejo de enzimas recombinasas, RAG1 y RAG2, el cual reconoce SSR ubicadas en los extremos 5' y/o 3' de cada segmento V, D y J codificante (4). Durante este proceso de recombinación puede producirse la delección de algunos nucleótidos de las secuencias germinales de los segmentos utilizados, por imprecisiones del complejo enzimático involucrado. Además, por la presencia de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), se produce la inserción al azar de nuevos nucleótidos en la región 3' del ADN entre los segmentos V, D y J. De esta manera, las secuencias de los genes Ig/TCR, resultantes de las regiones de unión de los genes reordenados V-(D)-J, son únicas y específicas de cada clon linfóide que las genera, independientemente de que sea normal o maligno, y son consideradas como una "huella digital" del clon linfóide (3).

La detección y caracterización molecular de los reordenamientos de Ig y TCR tiene múltiples aplicaciones en la práctica de la Hemato-Oncología. Entre ellas, se destacan la determinación de clonalidad en procesos linfoproliferativos, el diagnóstico diferencial entre una recaída de la enfermedad leucémica original *versus* segundas enfermedades malignas, en la confirmación de cambios de linaje de blastos intra o postratamiento (5) (6) (7). Pero, sin dudas, una de las aplicaciones más importantes es su utilización como blanco molecular para la cuantificación de la enfermedad mínima residual (EMR) en leucemia linfoblástica aguda (LLA). Ésta es considerada como la técnica *gold standard* para tal determinación (8). Actualmente se ha demostrado que la EMR es uno de los factores pronósticos más importantes para la evaluación *in vivo* de la respuesta al tratamiento en LLA pediátrica y constituye una información esencial para la toma de decisiones clínicas acerca de la intensidad de quimioterapia que debe recibir el paciente.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la incidencia de los distintos reordenamientos de Ig/TCR, de los segmentos V, D y J involucrados, y las recombinaciones V-(D)-J más frecuentemente halladas en nuestra población de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA, con el fin de caracterizar los blastos leucémicos.

Materiales y Métodos

La población de estudio estuvo constituida por los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA que ingresaron a los centros participantes de la Sociedad Argentina de Hemato-Oncología Pediátrica (SAHOP), incluidos en los Protocolos de Tratamiento ALLIC-BFM 2002/HPG, ALLIC-BFM 2009/HPG, Interfant-99 e Interfant-06. Los centros participantes de SAHOP fueron: Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Hospital de Niños de San Isidro, Hospital Nacional de Clínicas, Hospital del Niño Jesús de Tucumán, Hospital Eva Perón de Catamarca, Hospital Juan Pablo II de Corrientes y Hospital Avelino Castelán de Chaco.

El número de casos incluidos para analizar la incidencia de reordenamientos Ig/TCR fue de 769 pacientes, diagnosticados entre diciembre de 1999 y junio de 2018. Fueron ingresados en este estudio todos los pacientes menores de 17 años que reunieron los criterios de diagnóstico de LLA, que tuvieron estudios diagnósticos completos: morfológicos, de citometría de flujo, moleculares y citogenéticos y en los cuales fue posible la obtención de ADN para la determinación del perfil molecular de reordenamientos de Ig/TCR completo. Se excluyeron del estudio todos los pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento quimioterápico previo al diagnóstico de LLA y los pacientes con patologías subyacentes que son causa de comorbilidades (síndrome de Down, inmunodeficiencias, síndromes de fragilidad cromosómica, HIV+).

Las determinaciones se realizaron a partir de células mononucleares obtenidas por centrifugación con gradiente de densidad de muestras de médula ósea (o sangre periférica cuando el recuento leucocitario fue mayor de $100 \times 10^9/L$ con evidencia de más de 80% de blastos) y preservadas a $-80^\circ C$ hasta su utilización.

La caracterización de los reordenamientos Ig/TCR fue realizada a partir de ADN genómico de alto peso molecular. El ADN total correspondiente a 10^7 células mononucleares fue extraído utilizando un *kit* de extracción de ADN *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemania). Para comprobar la integridad de las muestras y la ausencia de posibles inhibidores de reacción se realizó la amplificación del gen *ABLI* como control.

Las determinaciones por PCR de las recombinaciones de segmentos de las regiones variables de Ig/TCR incluyeron la búsqueda de reordenamientos completos e incompletos de *IGH*, *IGK*, *TCRB*, *TCRG* y *TCRD*.

Los oligonucleótidos y protocolos utilizados han sido estandarizados y publicados por el grupo cooperativo europeo Biomed-2 (9). Se realizaron para ello 15 reacciones de PCR *multiplex* por paciente. Para la detección de reordenamientos clonales, el producto de PCR fue sometido al proceso de *heteroduplex* y posterior visualización mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y observación bajo luz ultravioleta previa tinción con bromuro de etidio. Las bandas de *homoduplex* obtenidas fueron eluidas y secuenciadas por el método de Sanger, utilizando el equipo de secuenciación Big Dye Terminator v1.1 (*Applied Biosystems*, California, Estados Unidos) y el secuenciador automático de ADN (Modelo ABI3130 o ABI3500; *Applied Biosystems*, California, Estados Unidos). Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando los programas *IMGT/V-quest* e *Ig-Blast*, de acceso libre a través de internet (10) (11) (12).

Resultados

Las características clínicas, de laboratorio, de inmunofenotipo y las alteraciones genéticas de los 769 pacientes estudiados se muestran en la Tabla I.

Del total de los 769 pacientes, en el 95% (n=730) se pudo detectar al menos un reordenamiento clonal de Ig/TCR. Se detectó un promedio de 3 reordenamientos por paciente, con un rango que varió de 0 a 12. En el 5% (n=39) de los casos, no fue posible detectar recombinaciones de genes Ig/TCR. En este último grupo, el 62% de los casos correspondieron a LLA precursor B, 26% a LLA precursor T, y el 12% restante a leucemias agudas de linaje ambiguo (LALA). Adicionalmente, el 21% de los pacientes sin reordenamientos de Ig/TCR fueron menores de 1 año y la mediana de edad del grupo fue de 5,9 [0,1-15,3] años.

Teniendo en cuenta el total de pacientes que presentaron recombinaciones de segmentos Ig/TCR, en el 68% de los casos se caracterizaron reordenamientos IGH, en el 43% IGK, en el 25% se detectaron reordenamientos TCRB, en el 49% TCRG y en el 55% de los casos se encontraron recombinaciones genéticas TCRD.

Un total de 2506 reordenamientos de Ig y TCR fueron caracterizados y analizados a partir de los 730 pacientes que presentaron algún producto clonal, para determinar la incidencia de las recombinaciones genéticas de Ig y TCR individuales.

Se identificaron en total 1161 reordenamientos de inmunoglobulinas que comprendieron 696 recombinaciones genéticas de cadenas pesadas IgH y 465 cadenas livianas *Kappa*, mientras que en los receptores de linfocitos T se detectaron en total 1345 reordenamientos, de los cuales 168 correspondieron a TCRB, 533 recombinaciones a TCRG y 644 a TCRD. Es decir que, del total de reordenamientos detectados, el 28% correspondieron a IGH, 19% a IGK, 7% a TCRB, 21% a TCRG y 26% a TCRD.

Con respecto a las frecuencias de reordenamientos de Ig/TCR en relación con el inmunofenotipo, en los pacientes con fenotipo LLA precursor B, se detectó una frecuencia variable de recombinaciones genéticas en cadenas IGH e IGK y receptores TCR, mientras que en los casos de LLA precursor T, se observaron frecuencias significativamente mayores de reordenamientos en las cadenas TCRB, TCRG y TCRD respecto a IGH e IGK ($p < 0,00001$) (Fig. 1).

Análisis de la región de unión V-(D)-J de los genes de inmunoglobulinas

La incidencia de las diferentes recombinaciones de segmentos V-(D)-J de las cadenas completas e incompletas de IGH e IGK se muestra en la Tabla II. Como se

Tabla I. Características clínicas, de laboratorio, inmunofenotipo y alteraciones genéticas de los 769 pacientes estudiados para incidencia de reordenamientos Ig/TCR.

Población total	
Pacientes	769
Sexo (M:F)	431:338
Edad (años)	
Promedio	6,2
Mediana	5,0
Rango	0,1-16,9
Infantes (n)	55
Recuento leucocitario ($\times 10^9/L$)	
Promedio	72,2
Mediana	13,2
Rango	0,3-857,0
Promedio hemoglobina (g/dL)	7,8
Promedio plaquetas ($\times 10^9/L$)	85,3
Inmunofenotipo (n)	
LLA Prob B	35
LLA Común	406
LLA Pre B	202
LLA B madura	4
LLA B no determinada	8
LLA T	98
LALA	16
Alteraciones genéticas recurrentes (n)	
t(1;19)(q23;p13), <i>TCF3-PBX1</i>	35
t(9;22)(q34;q11), <i>BCR-ABL1</i>	33
t(12;21)(p13;q22), <i>ETV6-RUNX1</i>	102
11q23, <i>KMT2A</i> reordenado	55
Hiper >50 crom.	141
Hipo <45 crom	2
Normal	131
Otras alteraciones	270

M: masculino. F: femenino. LLA: leucemia linfoblástica aguda. LALA: leucemia aguda de linaje ambiguo. Hiper: hiperdiploides. Hipo: hipodiploides. Crom: cromosomas.

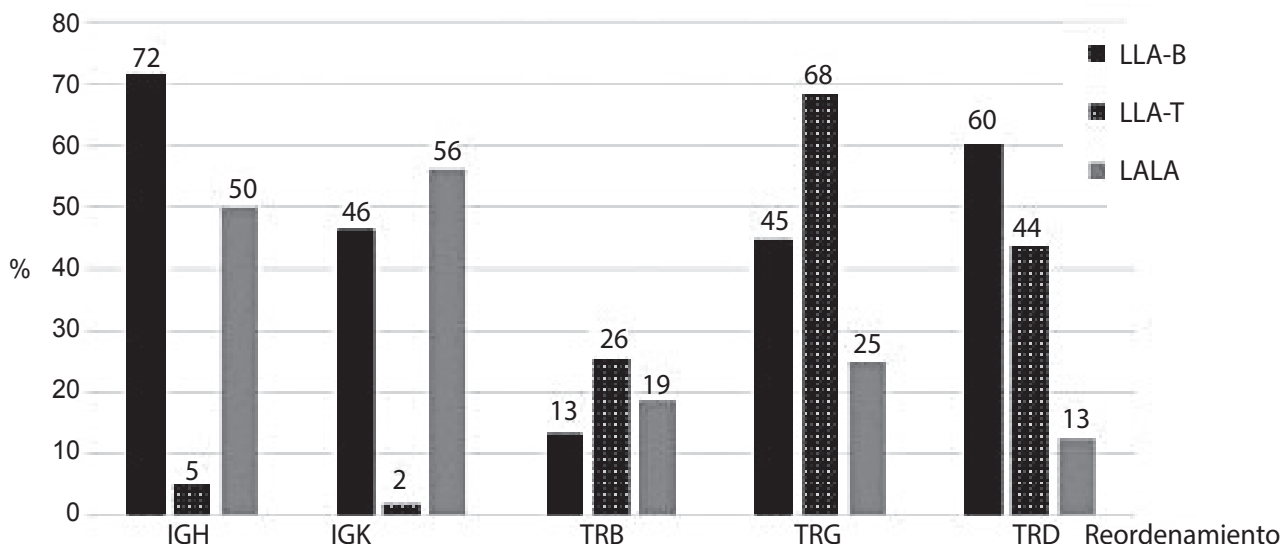


Figura 1. Frecuencia de reordenamientos Ig/TCR del total de pacientes estudiados de acuerdo con el inmunofenotipo.

LLA: leucemia linfoblástica aguda. LALA: leucemia aguda de linaje ambiguo.

puede observar, los reordenamientos más frecuentes en *IGH* fueron las recombinaciones completas Vh-Dh-Jh, mientras que para *IGK*, fueron los reordenamientos que involucraron el elemento de delección IGKde.

En la Figura 2.A se describe la incidencia de las distintas familias de segmentos génicos IGH del total de reordenamientos caracterizados y se observa que los segmentos involucrados con mayor frecuencia en las recombinaciones génicas fueron los miembros de la familia Vh3 (39%), Vh4 (21%) y Vh1 (19%), los segmentos Dh2 (32%), Dh3 (30%) y Dh6 (13%) y miembros de la familia Jh6 (36%), Jh4 (36%) y Jh5 (16%). Al analizar la frecuencia de recombinación de las distintas familias de segmentos génicos de IGH Vh con Jh4, Jh5 y Jh6, por ser los segmentos Jh más frecuentemente encontrados, se observó que los reordenamientos con el segmento VH3 fueron los más frecuentes, en el 36%, 34% y 35% de los casos, respectivamente. Adicionalmente, se observó que los reordenamientos más frecuentes que involucraron al segmento Jh4 fueron

Vh3-Dh3-Jh4 y Vh4-Dh3-Jh4, para el segmento Jh5 las recombinaciones Vh3-Dh2-Jh5 y Vh4-Dh2-Jh5 y finalmente, los reordenamientos Vh3-Dh3-Jh6 y Vh3-Dh2-Jh6 para Jh6.

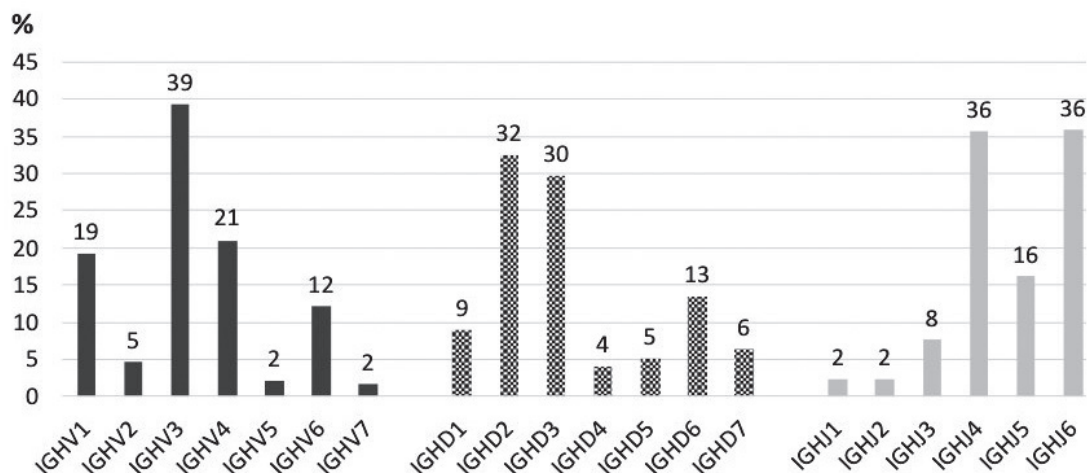
En cuanto a los reordenamientos en el *locus IGK*, los miembros de las familias Vk1 (29%), Vk2 (22%) y el reordenamiento que involucra la señal en el intrón (20%) fueron los más frecuentemente identificados, así como el elemento IGKde (66%) y las familias Jk4 (11%), y Jk2 (9%) (Fig. 2.B). Además, el segmento Jk4 se reordenó con mayor frecuencia con los segmentos Vk1 (47%), Vk2 (34%) y Vk3 (13%), cubriendo un 94% de los casos. Del total de 309 reordenamientos que involucraron al segmento IGKde, el 30% fueron intrón-Kde, el 22% Vk1-Kde y el 20% Vk2-Kde.

Con respecto a la complejidad observada en los reordenamientos, representada por nucleótidos insertados y deletados, la media de nucleótidos deletados de los segmentos Vh, Dh y Jh, de IGH fue de 5 (rango=0-49) y de nucleótidos insertados de 7 (rango=0-40). Para IGK

Tabla II. Incidencia detallada de los diferentes reordenamientos génicos de inmunoglobulinas caracterizados.

Inmunoglobulinas					
IGH			IGK		
Reordenamiento	n	%	Reordenamiento	n	%
Totales	696		Totales	465	
IGHD-IGHJ	79	11	IGKV-IGKde	217	47
IGHD-IGHD-IGHJ	8	11	Intrón-IGKde	92	20
IGHV-IGHJ	21	3	IGKV-IGKJ	156	33
IGHV-IGHD-IGHJ	560	81			
IGHV-IGHD-IGHD-IGHJ	28	4			

A



B

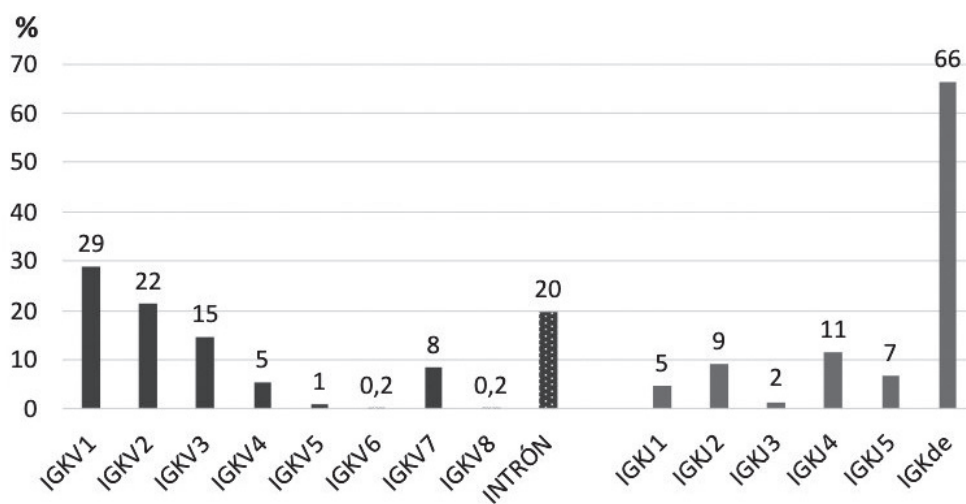


Figura 2. Incidencia de familias de segmentos génicos V-(D)-J de inmunoglobulinas.

A. Locus IGH. B. Locus IGK.

la media de delección de Vk, intrón, Jk y Kde y las inserciones entre las recombinaciones génicas Vk-Jk, intrón-Kde y Vk-Kde fue de 5 (rango=0-46) y 5 (rango=0-30) nucleótidos, respectivamente.

Análisis de la región de unión V-(D)-J de los receptores de linfocitos T

En el caso de los receptores de linfocitos T, se identificaron en total 1345 reordenamientos, de los cuales 168 fueron TCRB, 533 TCRG y 644 TCRD.

La incidencia de las diferentes recombinaciones de segmentos V-(D)-J de las cadenas completas e incompletas de TCR se muestra en la Tabla III. Como se puede observar, en TCRB se encontró una proporción semejante de reordenamientos completos e incompletos, Vb-Db-Jb y Db-Jb; mientras que para TCRD, se caracterizaron con mayor frecuencia reordenamientos incompletos Vd-Dd.

Cuando se analizaron los reordenamientos del *locus* TCRB, se observó que las recombinaciones de segmentos más frecuentes involucraron a los miembros de la familia Vb12 (11%), Vb7 (7%); y a los segmentos Jb2,3 (16%), Jb2,5 (23%) y Jb2,7 (20%). Los segmentos Db1 y Db2 estuvieron involucrados en los reordenamientos en similares proporciones (Fig. 3.A). Pudo observarse que los segmentos Jb caracterizados con mayor frecuencia (Jb2,3, Jb2,5 y Jb2,7), se reordenaron preferentemente con el segmento Db2 formando recombinaciones génicas incompletas.

En el caso del *locus* TCRG, los reordenamientos más frecuentes fueron los que involucraron a los segmentos génicos Vg9 (26%), Vg2 (21%) y Vg3 (17%); y a las familias Jg1 (68%) y JPg1 (18%) (Fig. 3.B). Las recombinaciones génicas Vg2-Jg1 y Vg9-Jg1 fueron las más habitualmente halladas.

En el *locus* TCRD, se pudo observar que los reordena-

Tabla III. Incidencia detallada de los diferentes reordenamientos génicos del receptor de linfocitos T caracterizados.

Receptor de linfocitos T								
TCRB			TCRG			TCRD		
Reordenamiento	n	%	Reordenamiento	n	%	Reordenamiento	n	%
Totales	168		Totales	533		Totales	644	
TRBD-TRBJ	75	45	TRGV-TRGJ	533	100	TRDV-TRDD	333	52
TRBV-TRBJ	15	9				TRDD-TRDD	163	25
TRBV-TRBD-TRBJ	78	46				TRDD-TRDJ	3	0,5
						TRDD-TRDD-TRDJ	4	0,6
						TRDV-TRDD-TRDD	6	0,9
						TRDV-TRDD-TRDJ	126	19
						TRDV-TRDD-TRDD-TRDJ	9	2

mientos que involucraron a los segmentos Vd2 (68%) y Dd3 (67%) fueron los más frecuentemente detectados (Fig. 3.C).

Como se puede observar en la Tabla III, el 79% de los reordenamientos de TCRD detectados fueron incompletos, de los cuales, el 97% de las recombinaciones Vd-Dd correspondieron a Vd2-Dd3 y todos los reordenamientos Dd-Dd caracterizados fueron Dd2-Dd3, como resultado de la estrategia metodológica empleada. El 19% de los reordenamientos TCRD fueron recombinaciones completas con un segmento Dd. El reordenamiento Vd2-Dd3-Ja29 fue el más frecuente (60% de los casos). El 2% restante de los reordenamientos totales de TCRD fueron recombinaciones génicas completas con 2 segmentos Dd, donde el reordenamiento Vd1-Dd2-Dd3-Jd1 fue el más común.

En los reordenamientos TRDV2-TRAJ el subgrupo Vd2 se detectó con mayor frecuencia en recombinación con el gen TRAJ29 y, en menor frecuencia, con Ja36, Ja48, Ja58 y Ja61, producto de la estrategia de búsqueda utilizada.

Con respecto a la complejidad observada en los reordenamientos, representada por nucleótidos insertados y deletados, la media de nucleótidos deletados e insertados de los segmentos V-(D)-J de los productos TCRB fue de 5 (rango=0-37) y 5 (rango=0-24); TCRG 4 (rango=0-41) y 6 (rango=0-26); y TCRD 5 (rango=0-33) y 6 (rango=0-35), respectivamente.

Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo fue realizado el estudio de la incidencia de reordenamientos de inmunoglobulinas y receptores de linfocitos T en un total de 769 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA. Las frecuencias halladas de los reordenamientos fueron, IGH en el 68% de los casos e IGK en el 43% (principalmente IGKde); mientras que, para los receptores de linfocitos T, TCRD

fue el más frecuentemente hallado con el 55% de los casos, seguido de TCRG en el 49% y TCRB en el 25%.

Cuando se compararon las incidencias de las recombinaciones de segmentos V-(D)-J de las Ig/TCR de la población de pacientes estudiada con series internacionales se pudo observar que los reordenamientos de IGKde y TCRD mostraban una incidencia similar, en rangos de 40-43% y 55-61%, respectivamente (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Sin embargo, se encontró que la frecuencia de reordenamientos IGH de la población estudiada era inesperadamente menor que lo publicado previamente por grupos europeos de referencia, como los polacos, holandeses e italianos, un grupo de la India, así como por un grupo chileno, con frecuencias de 74%, 82%, 77%, 98% y 100%, respectivamente (15) (16) (17) (18) (19) (20).

En cuanto a TCRG, los resultados hallados en el presente trabajo son similares a los descriptos por el grupo polaco (21), pero difieren de los resultados publicados por el grupo brasilero quienes encontraron reordenamientos TCRG en el 69% de los pacientes (14).

El resultado de la comparación de incidencias de reordenamientos de la Argentina con otros grupos latinoamericanos, como Chile y Brasil, contradice la postulación de Scridelli *et al.*, al suponer que regiones con similitud socioeconómica y étnica presentarían hallazgos similares (22).

Para confirmar si los factores socioeconómicos, étnicos y geográficos tienen implicancia en los perfiles de reordenamientos génicos, probablemente, debería realizarse una mayor cantidad de estudios en pacientes de diferentes poblaciones, sobre todo latinas, que incluyan además variables socioeconómicas y caracterización étnica precisa.

En cambio, cuando se compara la frecuencia de los reordenamientos Ig/TCR, pero particularmente la población de pacientes con LLA de fenotipo B, se encuentra que los reordenamientos IGH, IGKde, TCRG y TCRD presentaron una incidencia similar a la mencionada en

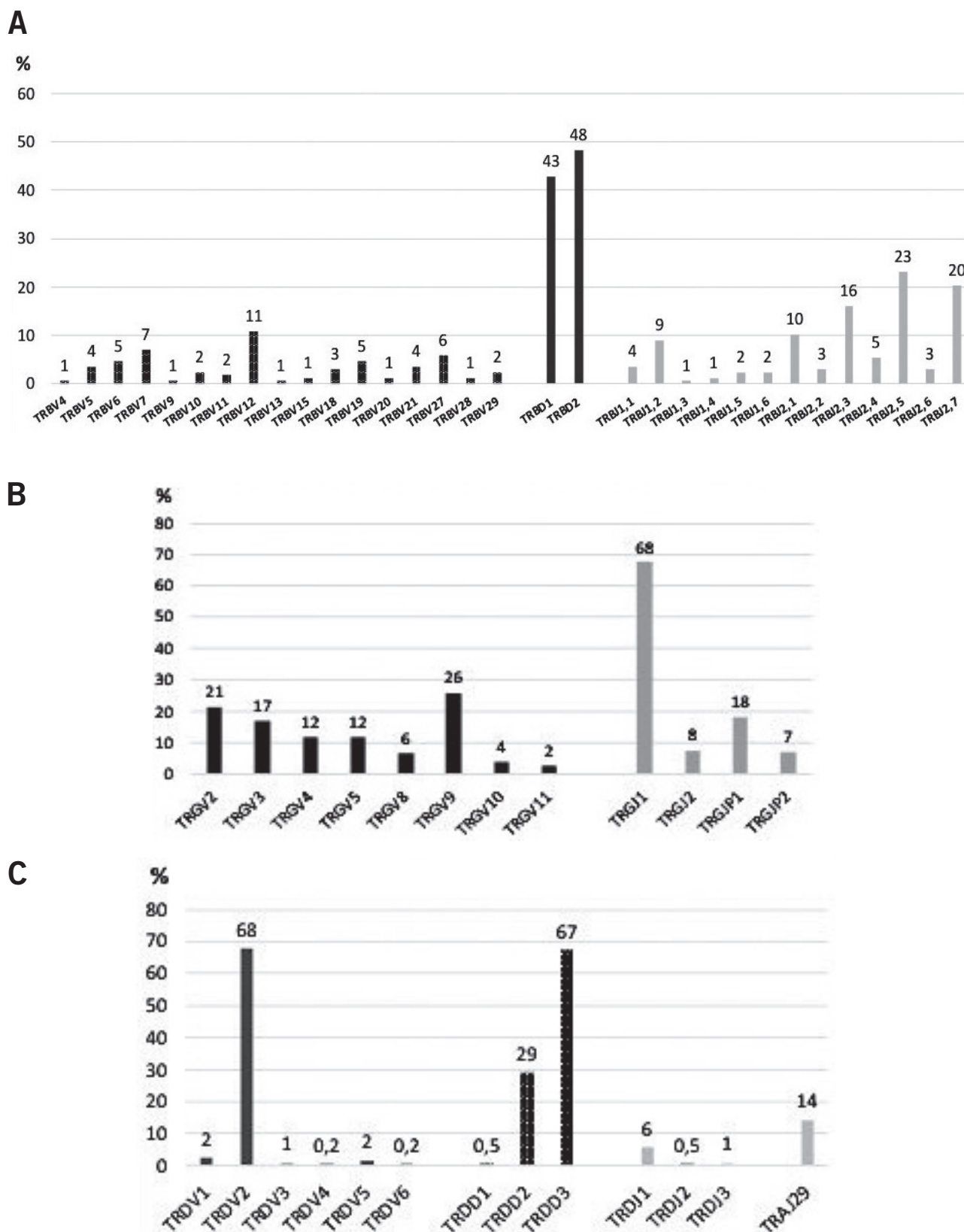


Figura 3. Incidencia de familias de segmentos génicos V-(D)-J de TCR.
 A. Locus TCRB. B. Locus TCRG. C. Locus TCRD.

las publicaciones internacionales (20) (21) (22) (23). Esto hace suponer que la menor incidencia de IGH y TCRG en la población total de pacientes se debería a una menor frecuencia de los reordenamientos en los casos con fenotipo LLA-T y LALA. De hecho, cuando se analizó al grupo particular de pacientes con LLA-T, se pudo observar que la incidencia de reordenamientos TCRG (68%), fue menor a la informada por un grupo brasilero que publicó frecuencias del 94% y 100%, aunque con un menor número de pacientes (14) (24).

Al evaluar la situación de los reordenamientos TCRB, se pudo observar que la incidencia en el total de la población fue similar a los resultados de grupos holandeses (17), pero en los pacientes con LLA-B (13%) fue menor que lo descrito por el grupo de Szcsepanski *et al.*, cuya frecuencia fue del 35%. Esta diferencia probablemente se debe a la diferente metodología de estudio empleada, ya que el grupo holandés utilizó la técnica de *Southern blot* para la caracterización clonal, la cual presenta mayor sensibilidad de detección (25). Similares hallazgos se encontraron al comparar nuestros resultados con los publicados por Van der Velden *et al.* que reportaron una incidencia de 33% de TCRB mediante PCR *mutiplex* (17).

De acuerdo con los resultados de este trabajo es de destacar que se detectaron reordenamientos génicos de TCR en LLA de fenotipo B y, en menor medida, reordenamientos de Ig en LLA T. La aparición de reordenamientos de linaje cruzado ha sido ampliamente descrita en la bibliografía, y hace referencia a la presencia de recombinaciones de segmentos V-(D)-J de TCR en linfoblastos de fenotipo B y, a la inversa, reordenamientos de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas en blastos de linaje T. Una posible explicación de este fenómeno podría ser la aberrante actividad de las recombinasas en las células transformadas, debido a una mayor actividad y en tiempos más prolongados de la acción de las enzimas RAG1 y RAG2, lo cual podría favorecer el surgimiento de reordenamientos genéticos atípicos en las células leucémicas (25). Este fenómeno contribuye enormemente en la diversidad de reordenamientos V-(D)-J en los linfoblastos ampliando la posibilidad de detección de blancos moleculares para EMR y, por otro lado, demuestra que se debe ser cauteloso en asignar linaje a una población en procesos linfoproliferativos sin realizar una exhaustiva caracterización fenotípica, ya que la mera presencia de reordenamientos de Ig o TCR, no es específica e indicativa de linaje B o T, respectivamente.

En el caso particular de las LLA de fenotipo T, se pudo observar una frecuencia significativamente menor de reordenamientos completos e incompletos IGH e IGK, y mayor frecuencia de reordenamientos completos e incompletos de TCRB y completos de TCRD que en el resto de los pacientes, lo cual sigue en línea con lo publicado en series internacionales donde se

muestra una baja incidencia de reordenamientos de inmunoglobulinas en este grupo fenotípico (26).

Adicionalmente, se analizaron las frecuencias de los segmentos génicos variables, de diversidad y de unión en los reordenamientos Ig/TCR identificados, para determinar los perfiles V-(D)-J más frecuentemente utilizados y obtener una información más detallada de los mismos. Los reordenamientos en el *locus* IGH con mayor frecuencia involucraron a los miembros de la familia Vh3, Vh4y Vh1, los segmentos Dh2 y Dh3, y miembros de la familia Jh6, Jh4 y Jh5, y principalmente fueron reordenamientos completos. La frecuencia de reordenamientos Jh6 (36%) de la población estudiada fue menor que en los resultados publicados por otros grupos europeos (61%) (27).

De los reordenamientos en el *locus* IGK, los miembros de las familias Vk1, Vk2 e Intrón, así como IGKde (66%), Jk4 y Jk2 fueron los más frecuentemente identificados. Hallazgos similares fueron descritos por el grupo austríaco y suizo, aunque con una incidencia menor de IGKde del 44% y 42%, respectivamente (23) (28).

En el *locus* TCRB, los reordenamientos mostraron un uso casi restringido del segmento génico Jb, ya que la mayoría de los reordenamientos involucraron el *locus* Jb2. Los segmentos Db1 y Db2 mostraron reordenarse en similares proporciones, mientras que la utilización de segmentos Vb fue muy variada, sin segmentos destacados por frecuencia. Estos hallazgos fueron similares a los publicados por Van der Velden *et al.* (17).

En el *locus* TCRG, los reordenamientos más frecuentes fueron los que involucraron a las familias génicas Vg9, y Vg2, y a las familias Jg1 y JPg1. Si se comparan los resultados de este trabajo con los del grupo brasilero, por similitud geográfica, se pueden observar pequeñas variaciones de incidencias en Vg9 (30% y 37%, respectivamente) y en Vg2 (18% y 11%, respectivamente), pero una diferencia notoria en la frecuencia de Jg1 (68% *vs.* 84%, respectivamente). Debe tenerse en cuenta que el grupo de trabajo brasilero analizó una población de pacientes más pequeña que la descrita en el presente trabajo (n=108) (24).

En el *locus* TCRD se pudo observar que el 79% de los reordenamientos detectados fueron incompletos y Vd2-Dd3 y Dd2-Dd3 fueron los más frecuentes. De los reordenamientos completos, las recombinaciones que involucraron a Ja29 y Jd1 fueron las más comúnmente caracterizadas, incluyendo en la mayoría de los casos a Vd2. Es importante aclarar que, a diferencia del reordenamiento jerárquico que ocurre en las cadenas de IGH y TCRB, donde los segmentos D se reordenan en primer lugar con segmentos J y luego V se une al DJ, en el *locus* TCRD, los reordenamientos VD y DD ocurren con mayor frecuencia que los DJ. Estos hallazgos han sido corroborados por los resultados de este trabajo.

La diversidad de regiones variables de estos receptores se basa en el número de segmentos disponibles para

recombinación y en la variedad de regiones de unión entre los segmentos de reordenamiento. La enzima TdT tiene un papel clave en la generación de diferentes regiones de unión.

Al analizar en detalle las características de la región de unión de los segmentos V-(D)-J de los diferentes reordenamientos se pudo observar que los tamaños entre ellos eran similares, tanto en reordenamientos completos como incompletos, con un promedio total de inserción de 6 nucleótidos en un rango de 0 a 40. Las deleciones de los segmentos V, D y J detectadas en los diferentes reordenamientos génicos, también fueron similares, con una media de deleción en segmentos V de 4 nucleótidos, de 4 en D y de 5 en segmentos J.

Los resultados que forman parte del presente trabajo constituyen el primer estudio multicéntrico realizado en la Argentina sobre la detección y caracterización de reordenamientos génicos de inmunoglobulinas y receptores de linfocitos T en un número muy significativo de pacientes con diagnóstico de LLA. El hecho de haber sido identificados reordenamientos de Ig y TCR en el 95% de los casos, ha demostrado la factibilidad de emplear esta tecnología con fines de caracterización diagnóstica y determinación del grupo de riesgo de los pacientes a través de la medición de la respuesta *in vivo* al tratamiento.

Disponer de esta estrategia metodológica ha permitido no sólo conocer en detalle el perfil de reordenamientos de Ig/TCR de la población de pacientes estudiada, sino también, posibilitar que dichas recombinaciones génicas puedan ser utilizadas para establecer la relación clonal entre diagnósticos iniciales y probables segundas enfermedades malignas, brindar diagnósticos certeros en los casos con *switches* de linaje y para la determinación de la EMR a fin de aplicar una adecuada intensidad de tratamiento quimioterápico a los niños con LLA.

Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los doctores: María Angélica Fernández Barbieri, Ezequiel Recondo, Patricia Luna, María Soledad Vides Herrera, Cristina Cabral y Vanina Livio por sus importantes aportes. También agradece al Hospital de Niños de San Isidro, Hospital Nacional de Clínicas de CABA, Hospital del Niño Jesús de Tucumán, Hospital Eva Perón de Catamarca, Hospital Juan Pablo II de Corrientes y al Hospital Avelino Castelán de Chaco.

Correspondencia

Bioq. PATRICIA RUBIO

Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Servicio de Hematología y Oncología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" Combate de los Pozos 1881

(1245) CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina.

Correo electrónico: patrirubio@gmail.com

Referencias bibliográficas

- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la Inmunología Humana. 6ta ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 135-50.
- Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Laginestra MA, Sapienza MR, Fuligni F, *et al.* The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol* 2014; 5 (2): 35-47.
- Szczepański T, Flohr T, van der Velden VHJ, Bartram CR, van Dongen JJM. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002 Mar; 15 (1): 37-57.
- Lieber MR. The mechanism of V(D)J recombination: a balance of diversity. Specificity and stability. *Cell* 1992; 70: 873-6.
- Szczepański T, Willemse MJ, Kamps WA, van Wering ER, Langerak AW, van Dongen JJ. Molecular discrimination between relapsed and secondary acute lymphoblastic leukemia: proposal for an easy strategy. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 352-8.
- Rossi JG, Bernasconi AR, Alonso CN, Rubio PL, Gallego MS, Carrara CA, *et al.* Lineage switch in childhood acute leukemia: an unusual event with poor outcome. *Am J Hematol* 2012; 87 (9): 890-7.
- Cervini AB, Torres-Huamani AN, Sanchez-La-Rosa C, Galluzzo L, Solernou V, Rubio P. Micosis fungoide. Experiencia en un hospital pediátrico. *Actas Dermosifiliogr* 2017; 108 (6): 564-70.
- Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, *et al.* Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 22 (4): 771-82.
- van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-317.
- Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR

- standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 503-8.
11. Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences. *Cold Spring Harb Protoc* 2011; 6: 695-15.
 12. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 307-10.
 13. Szczepański T, van der Velden VH, Hoogeveen PG, de Bie M, Jacobs DC, van Wering ER, *et al.* VD2-J gene rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but rare in normal lymphoid cells. *Blood* 2004; 103 (10): 3798-804.
 14. Ganazza MA, Assumpção JG, de Araújo M, Scrideli CA, Tone LG, Brandalise SR, *et al.* TCRG gene rearrangement patterns Brazilian children with ALL: an update. *Leuk Res* 2009; 33 (12): e228-9.
 15. Germano G, del Giudice L, Palatron S, Giarin E, Cazaniga G, Biondi A, *et al.* Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2003; 17: 1573-82.
 16. van der Velden VH, Szczepański T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC, *et al.* Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2003; 17: 1834-44.
 17. van der Velden VH, Brüggemann M, Hoogeveen PG, de Bie M, Hart PG, Raff T, *et al.* TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia* 2004; 18: 1971-80.
 18. Sazawal S, Bhatia K, Gurbuxani S, Singh Arya L, Raina V, Khattar A, *et al.* Pattern of immunoglobulin (Ig) and T cell receptor (TCR) gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia in India. *Leuk Res* 2000; 24 (7): 575-82.
 19. Barriga FJ, Risueño C, Patillo JC, Andrade W, Cabrera ME, Beressi V, *et al.* Analysis of the complementary determining region III of the immunoglobulin heavy chain locus in acute lymphoblastic leukemia in Chilean children. *Leukemia* 1996; 10: 1719-23.
 20. Dawidowska M, Derwich K, Szczepański T, Jótkowska J, van der Velden VH, Wachowiak J, *et al.* Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements in Polish pediatric acute lymphoblastic leukemia patients--implications for RQ-PCR-based assessment of minimal residual disease. *Leuk Res* 2006; 30 (9): 1119-25.
 21. Meleshko AN, Lipay NV, Stasevich IV, Potapnev MP. Rearrangements of IgH, TCRD and TCRG genes as clonality marker of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp Oncol* 2005; 27: 319-24.
 22. Scrideli CA, Tone LG. Ig and TCR gene rearrangements in childhood ALL is there ethnic and socio-economic diversity of rearrangement patterns? *Leuk Res* 2006; 30: 1065-6.
 23. Thörn I, Forestier E, Thuresson B, Wasslavik C, Malec M, Li A, *et al.* Applicability of Ig/TCR gene rearrangements as targets for minimal residual disease assessment in a population-based cohort of Swedish childhood acute lymphoblastic leukaemia diagnosed 2002-2006. *Eur J Haematol* 2010; 84 (2): 117-27.
 24. Scrideli CA, Queiróz RG, Kashima S, Sankarankutty BO, Tone LG. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease. *Leuk Res* 2004; 28 (3): 267-73.
 25. Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, *et al.* 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 (2): 196-205.
 26. Brüggemann M, van der Velden VH, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, *et al.* Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18 (4): 709-19.
 27. Szczepański T, Willemse MJ, van Wering ER, van Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJ. Precursor-B-ALL with D_H-J_H gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001; 15 (9): 1415-23.
 28. Stolz F, Panzer S, Panzer-Grümayer ER. Multiplex PCR reaction for the detection and identification of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B-lineage leukaemias. *Br J Haematol* 1999; 106 (2): 486-90.

Recibido: 16 de abril de 2020

Aceptado: 11 de septiembre de 2020