

Estudio de la clonalidad linfoide por medio del análisis de reordenamientos del receptor de antígeno

Nicolás Villamizar-Rivera,^a Natalia Olaya^a

Clonality lymphoid study through rearrangement analysis of antigen receptor

Abstract

As a rule, malignant lymphoid proliferations are clonal. While most of the time the biological potential can be established through routine pathologic examination and auxiliary techniques, some cases are difficult to classify. Moreover, there are situations in which there are dominant clones whose analysis are important, such as occur in autoimmune diseases and immunodeficiency. This paper presents in an understandable way the main techniques for the study of clonality in lymphoid lesions, i.e. the analysis of rearrangements of antigen receptor genes by multiplex polymerase chain reaction (PCR) based tests.

Resumen

Las proliferaciones linfoides malignas suelen ser clonales. La mayoría de las veces el potencial biológico de una lesión se establece por medio del análisis clínico y el estudio anatomopatológico, pero algunos casos son de difícil diagnóstico. Por otra parte, existen situaciones en las cuales se producen clones dominantes cuyo análisis es importante, tal como ocurre en enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias. Este artículo presenta de manera comprensible las técnicas principales para el estudio de la clonalidad en lesiones linfoides, es decir, el análisis de reordenamientos de genes del receptor de antígeno por medio de pruebas basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex.

Keywords Palabras clave

DNA rearrangements	Linfomas
Lymphoma	Leucemias
Leukemia	Cáncer
Neoplasm	Reordenamiento génico
Clonal evolution	Evolución clonal

La teoría en boga para explicar el desarrollo del cáncer es la evolución. Algunas células somáticas se seleccionan y prevalecen a pesar de la lucha por el espacio y los nutrientes, y de los mecanismos de control de la división celular y del envejecimiento.¹ La existencia de clones dominantes suele definir la enfermedad.

Las leucemias y los linfomas son cánceres originados en los linfocitos o sus progenitores; afectan cualquier topografía corporal y a personas de todas las edades. Para diagnosticarlos y clasificarlos, se evalúan la morfología, el inmunofenotipo y ciertas alteraciones genéticas.² En las proliferaciones linfoides maduras se determina la relación de expresión de cadenas λ y κ de las inmunoglobulinas.³

Estos métodos permiten clasificar la mayoría de las lesiones, pero en casos difíciles los pacientes sufren retraso en su tratamiento o son sometidos a procedimientos inadecuados. La cantidad de lesiones de clasificación incierta varía, según la experiencia del centro diagnóstico. Además, a veces es necesario establecer la relación clonal entre dos lesiones o realizar un seguimiento posterior al tratamiento.⁴

El rearreglo de los genes del receptor de antígeno es un proceso fisiológico a partir de cuyo estudio puede determinarse la clonalidad linfoide. Son candidatos a este análisis las proliferaciones de células *B* de clasificación difícil, todas las lesiones de células *T*, y aquellas que ocurren en pacientes transplantados, inmunodeficientes, con enfermedades autoinmunes o asociadas a linfoproliferación, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal y la enfermedad celíaca.^{5,6}

Pretendemos introducir a los lectores en los principios científicos y de aplicación de la técnica para estudio de rearreglos de los genes de antígeno por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Reordenamiento del gen del receptor de antígeno

Los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y el receptor de los linfocitos T (TCR) están presentes en todas las células del organismo, pero a la manera de un rompecabezas sin armar. Los *loci* que codifican las cadenas pesadas de las Ig, las cadenas ligeras κ y λ de Ig (figura 1A), así como las cadenas α , β , γ y δ del receptor de

^aGrupo de Patología Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología-ESE, Bogotá, Colombia

Comunicación con: Natalia Olaya
Teléfono: (1) 334 11 11, extensión 4222
Correo electrónico: nolaya@cancer.gov.co

Recibido: 30/10/2013

Aceptado: 29/05/2014

linfocitos (TCR, por sus siglas en inglés) se encuentran en cromosomas diferentes (figura 1B). Además, existen varias secuencias posibles para cada uno de los segmentos que constituyen la región variable del gen. Por estas razones, la organización germinal de cada uno de los genes no puede transcribirse en ARNm⁷.

Solo los linfocitos requieren convertir los fragmentos génicos apartados en genes funcionales para los receptores de antígeno y así generar diversidad antigénica. En cada linfocito, la recombinación somática elabora un exón que codificará la región variable a partir de la selección de un segmento variable *V*, un segmento de unión *J* y un segmento de diversidad *D*, así como la adición de nucleótidos *N* y *P*. El segmento *D* solo está presente en los *loci* de las cadenas pesadas de Ig y los *loci* β y δ son exclusivos del TCR (figura 2). La recombinación alélica *VDJ* se regula por medio de exclusión alélica; una vez que un alelo se ha reordenado, se envía una señal al otro para interrumpir el proceso.^{7,8}

Los reordenamientos se realizan por medio de pasos secuenciales e invariables:

1. Sinapsis: el mecanismo enzimático detecta las secuencias señal de la recombinación o RSS (por sus siglas en inglés). Estas constan de tres porciones: un heptámero de nucleótidos conservados, un espaciador de 12 o 23 nucleótidos variables, y un nonámero de nueve nucleótidos rico en AT. Los

heptámeros son vulnerables a la VDJ recombinasa, un tetrámero constituido por las proteínas RAG 1 y 2. Estas enzimas son propias de los linfocitos en desarrollo y se encuentran inactivas durante la proliferación celular.

2. Escisión: son roturas en la doble cadena de ADN en las uniones entre la RSS y la secuencia codificadora. La unión entre los heptámeros se realiza eliminando el ADN entre ellos, o formando un bucle por inversión de las cadenas. Los extremos codificadores rotos finalizan por una horquilla cerrada.⁹
3. Apertura de las horquillas por medio de la enzima Artemisa, que es una endonucleasa, con el fin de que la enzima TDT añada nuevas bases en los extremos expuestos, aumentando la diversidad de las secuencias.
4. Unión y finalización por medio del sistema de unión de extremos no homólogo, un sistema de reparación de ADN presente en todas las células.

Más tarde, los linfocitos B maduros aumentan su repertorio combinatorial por medio de hipermutación somática, la cual ocurre en el centro germinal. Se caracteriza por la adición o sustracción de nucleótidos.⁸

Aún se ignora cómo un *locus* determinado se selecciona en un caso específico o por qué algunos fragmentos son elegidos con mayor frecuencia. En las neoplasias linfoides ocurren reordenamientos de uno u otro receptor independientemente del linaje de la

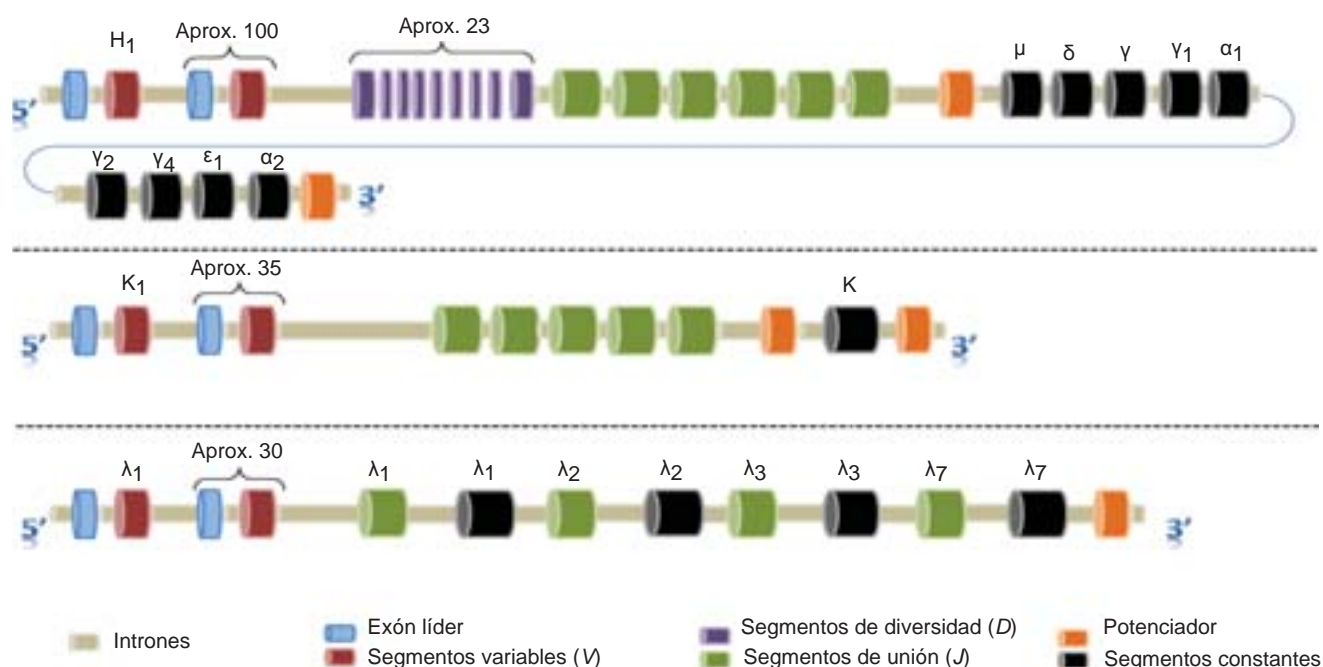


Figura 1A Estructura germinal de las cadenas de inmunoglobulinas (Ig)

Las cadenas H, K y λ de las inmunoglobulinas cuentan con un gran número de segmentos variables posibles, además de los segmentos de diversidad y de unión. A partir de ellos se crea el inmenso repertorio de las inmunoglobulinas.

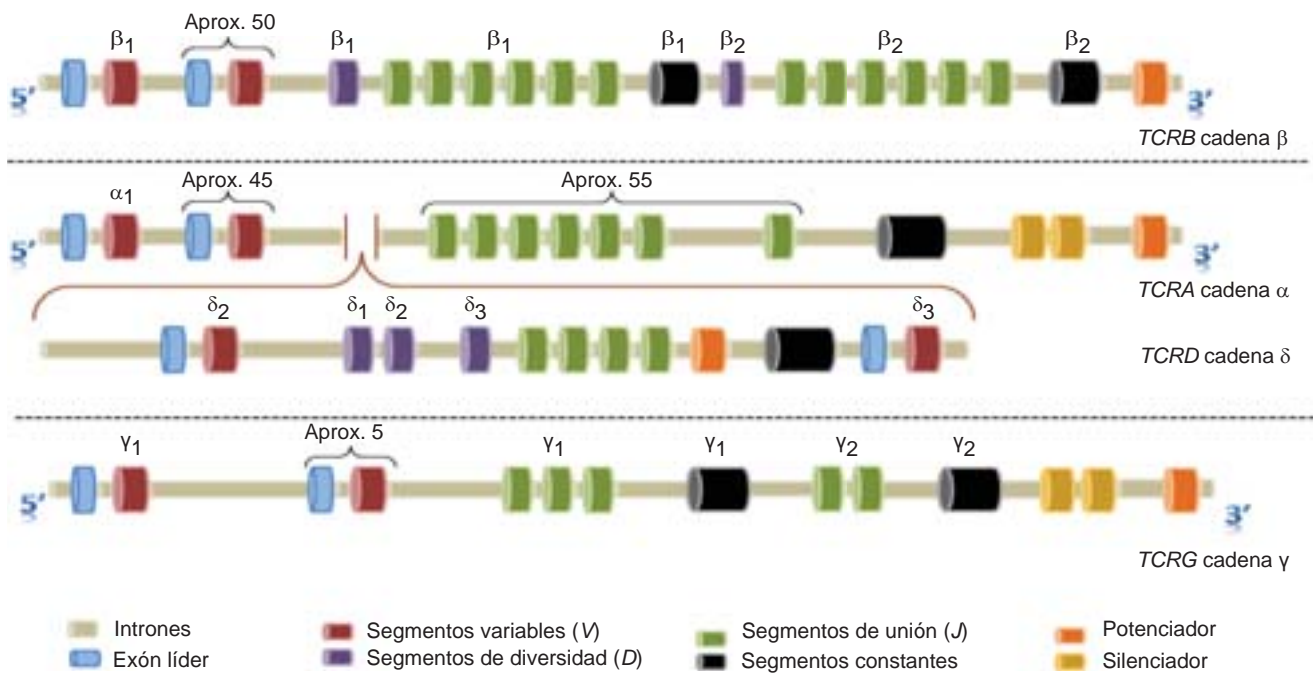


Figura 1B Estructura germinal del receptor del linfocito T (TCR)

Las cadenas del TCR también cuentan con un gran número de segmentos variables posibles, además de los segmentos de diversidad y de unión. El hecho de que la secuencia Delta se encuentre dentro de la cadena Alfa garantiza que al momento de reorganizarse uno no será posible que se reorganice el otro y así se evitan expresiones aberrantes del TCR.

lesión, pero durante el proceso fisiológico las regiones variables de las Ig son ensambladas en los linfocitos B, mientras que las regiones variables del TCR son acopladas solo en los linfocitos T.

nario entre la patología, la CF, la genética y la biología molecular.¹⁷

Principios técnicos

Durante mucho tiempo se utilizó el *Southern Blot*. La técnica es muy específica pero laboriosa y sus exigencias limitan la aplicación, pues se requiere de alrededor de 20 µg de ADN de buena calidad.¹⁰ Desde hace diez años existe un grupo de protocolos basados en PCR, denominados BIOMED-2.⁴ Estos fueron desarrollados por un conjunto de laboratorios europeos, el cual más tarde conformó el consorcio EuroClonality;¹¹ una parte de los materiales necesarios puede adquirirse a empresas comerciales.¹² Han aparecido numerosas publicaciones acerca de su desempeño y otras que ofrecen mejoras de la técnica original.^{13,14}

Los reordenamientos de TCR, particularmente el repertorio TCR β, pueden evaluarse por medio de citometría de flujo (CF).¹⁵ El consorcio Euroflow propone un panel de 24 anticuerpos, los cuales determinan el 70 % de los dominios.¹⁶ Además, la CF permite hacer rápidamente una evaluación cuantitativa y dar seguimiento.³

El estudio de los reordenamientos génicos del receptor de antígeno exige un ejercicio multidiscipli-

Procedimiento técnico

Muestras

Los protocolos técnicos están diseñados para usarse en tejido fresco o congelado. Sin embargo, se han realizado con éxito en tejidos parafrinados.^{18,19} Por otra parte, la CF permite la utilización de sangre, médula ósea y otros fluidos. Para cualquier tejido, la condición es que contenga una cantidad representativa de células problema.^{4,16}

El patólogo escogerá el área de tejido que va a examinar. Si es del caso, realizará macro o microdiseción de la muestra con el fin de enriquecerla en células problema, pero es importante que persistan poblaciones policlonales. Debe evitarse seleccionar regiones naturalmente oligoclonales, como los centros germinales de los folículos linfoides.

Los controles negativos son poblaciones policlonales de linfocitos, obtenidos a partir de sangre periférica o tejidos linfoides normales. Como controles positivos se usan líneas celulares comerciales con rearrreglos conocidos o lesiones clonales caracterizadas.^{4,20}

Para facilitar la interpretación, es necesario contar con información sobre el caso de estudio: datos demográficos y clínicos, informe de patología, inmunofenotipo, presencia y cantidad de linfocitos reactivos, etcétera. Los tratamientos recibidos afectan los resultados; por ejemplo, la administración de anti CD20 dificulta la determinación de la clonalidad de células B, y algunas traslocaciones, tales como t(11; 14) y t(14; 18) pueden dar resultados falsos negativos, ya que involucran rearrreglos aberrantes de IgH.²¹

Aislamiento de ácidos nucleicos y evaluación de la calidad

El tiempo de isquemia, los procedimientos de congelación y almacenamiento, y la inclusión en parafina afectan la calidad del ADN extraído a partir de los tejidos. Son importantes el tipo y el tiempo de fijación, el espesor del tejido, los procedimientos de extracción del ADN, y la presencia de inhibidores de la PCR.¹⁹

Las pruebas requieren ADN de alta pureza y baja fragmentación. Si se utilizan muestras frescas o congeladas, los métodos de extracción, tanto comercial como tradicional, funcionan bien, incluyendo el uso de extractores automáticos. En el caso del tejido en parafina, se recomienda el uso de formalina taponada al 10 % como fijador y un cuidadoso control de los tiempos de fijación. Aunque los protocolos BIO-

MED-2 recomiendan el kit QIAMP DNA Mini kit (QIAGEN®), otras publicaciones sugieren extracción orgánica y purificación.^{18,22} En cualquier caso, si se utiliza tejido en parafina se recomienda verificar que es amplificable al menos hasta 300 nucleótidos. El BIOMED-2 incluye un protocolo de amplificación que permite evaluar productos de varios tamaños, pero existen otras opciones.⁴

Selección de blancos

La selección de los fragmentos que se desea amplificar depende de la pregunta clínico-patológica y de la cantidad y la calidad del ADN extraído. En el caso de los tejidos parafinados, deberán casi siempre evaluarse los amplicones de menor tamaño. Además, la pregunta clínica ayuda, ya que la frecuencia y la distribución de los rearrreglos varía según la taxonomía tumoral (cuadro I).

Si la cantidad de células linfoides en la muestra es baja, como en las infiltraciones de piel o intestino, es necesario ajustar las cantidades de ADN y realizar las pruebas por duplicado. Se propone un algoritmo para la selección de los blancos moleculares (figura 3).

Amplificación y análisis de los amplicones

No es posible detectar por medio de PCR todos los segmentos génicos posibles, ya que se requerirían

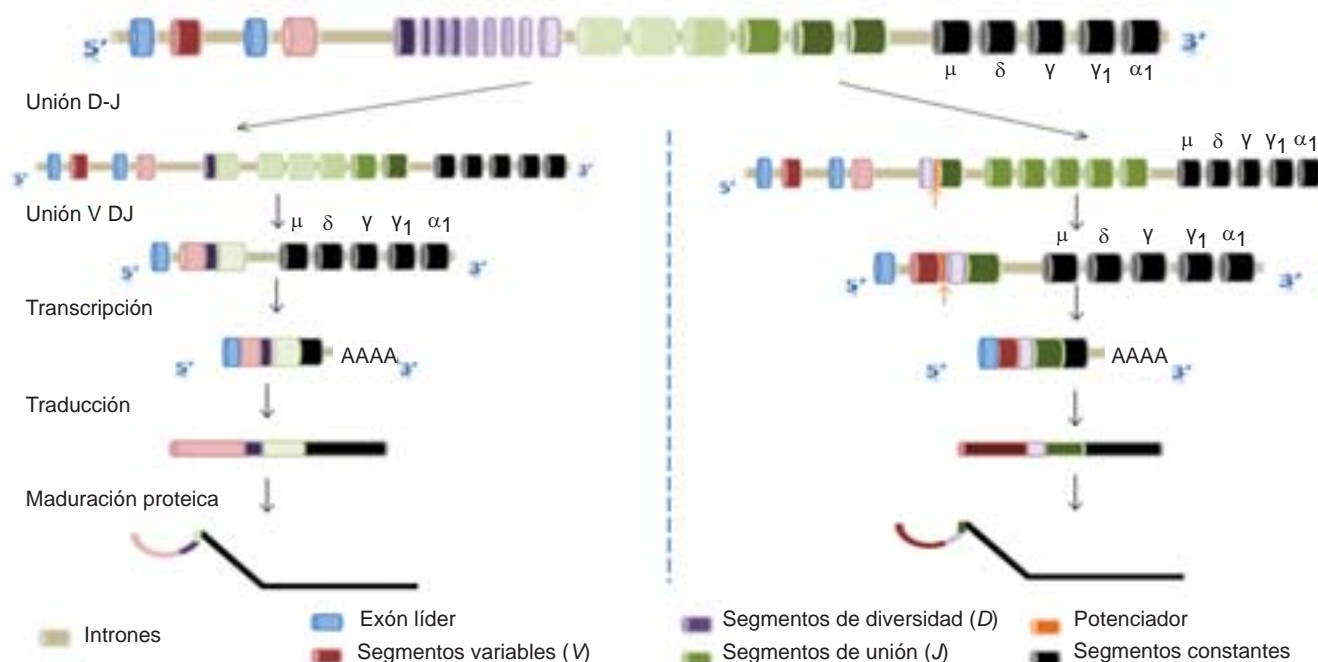


Figura 2 Proceso de recombinación del receptor del antígeno

En la figura se muestra el procesamiento de la cadena H de las inmunoglobulinas, pero los procesos son similares para las cadenas ligeras de Ig y el TCR. Este proceso permite obtener entre 1010 - 1018 combinaciones. Momentos antes de la transcripción del ADN se eliminan todos los segmentos constantes de la línea germinal excepto uno, el cual es el que se expresa. El segmento líder no se traduce a proteína

Cuadro I Sensibilidad de diversas técnicas para la detección de enfermedad mínima residual

Técnica	%
Microscopio de luz	1-5 %
Análisis de daños genéticos por medio de cariotipo o FISH	1-5 %
Citometría de flujo	0.01-1 %
PCR específica de paciente, RT-PCR	0.001 %

FISH = hibridación fluorescente *in situ*; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversal

demasiados *primers* y tubos. Por tal razón, se diseñaron grupos de PCR *múltiplex* que utilizan *primers* que reconocen la mayor parte de ellos y *primers consensus* que reconocen secuencias conservadas entre los fragmentos. No se requiere un termociclador especial.^{4,16}

El análisis de los productos de las PCR *múltiplex* se hace por medio de electroforesis en gel de acrilamida o capilar. También se ha usado electroforesis microcapilar de alta resolución por medio del equipo Agilent 2100 bioanalyzer.²³ Puede hacerse el aná-

lisis de fragmentos de doble cadena (formación de heterodupletas) y el análisis de productos de una sola cadena. Con el fin de inducir la formación de heterodupletas, los productos de PCR *múltiplex* se someten a calentamiento y enfriamiento rápido.²⁴ La presencia de un pico o banda dominante indica positividad para el rearrreglo estudiado y plantea indirectamente la presencia de un clon (figura 4).⁴

Interpretación y dificultades

Es preciso conocer la estructura de los genes que se van a evaluar, sus patrones de reordenamiento y las variaciones de estos; además, se deben verificar los patrones de expresión de los controles (cuadro II). No debe utilizarse la técnica para determinar el linaje de la lesión. Además, los resultados experimentales deben ser reproducibles.²⁵

Ocurren eventuales falsos positivos o negativos en la aplicación de estas pruebas. Muchos de ellos pueden evitarse por medio del análisis juicioso. Por ejemplo, el evaluador puede enfrentarse con productos de PCR que no cumplen, con la talla esperada

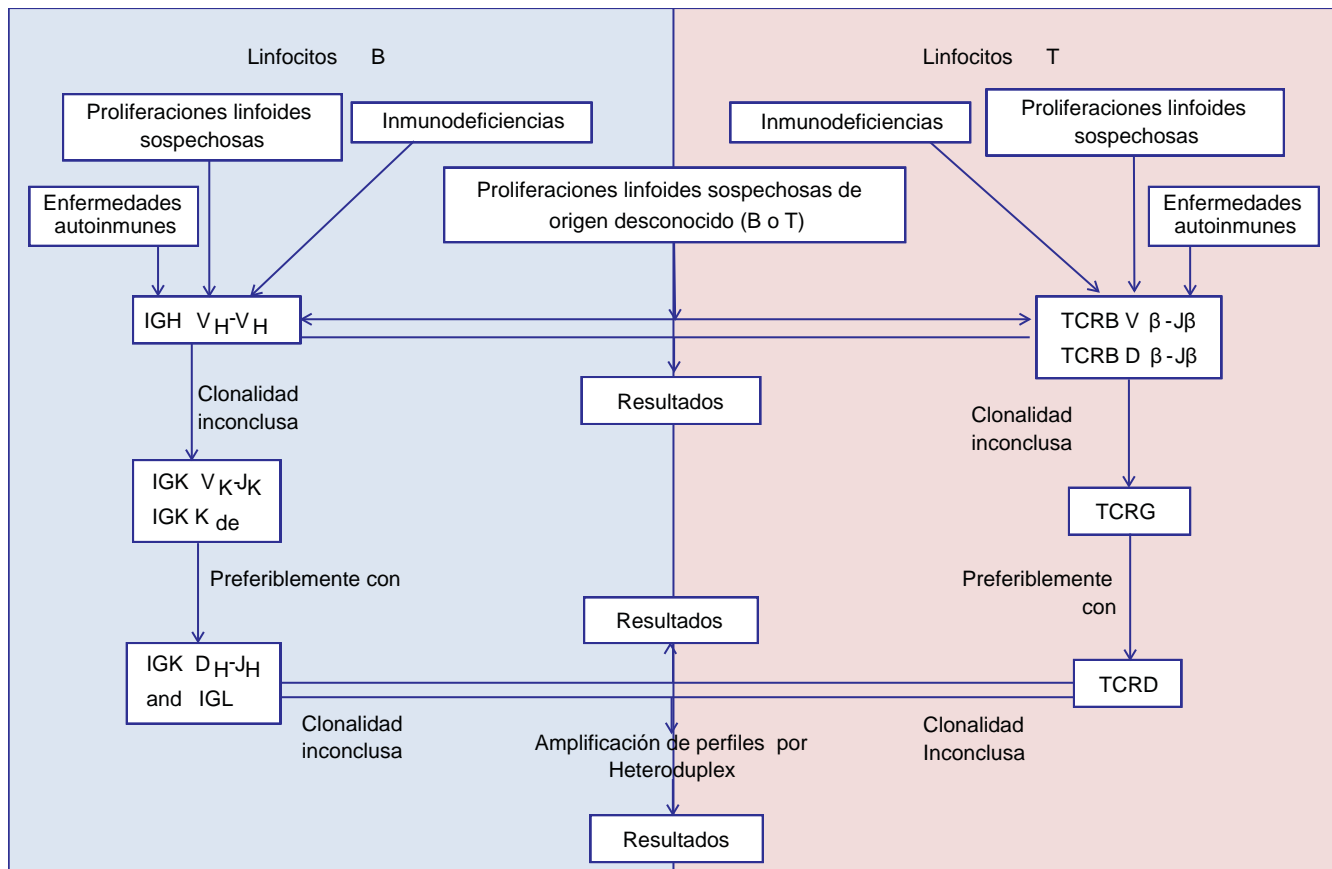


Figura 3 Algoritmo para el estudio de la clonalidad en lesiones de potencial biológico desconocido. Con el fin de utilizar el tiempo y los materiales de forma práctica, se recomienda el uso secuencial de los diversos tubos de PCR *múltiplex*

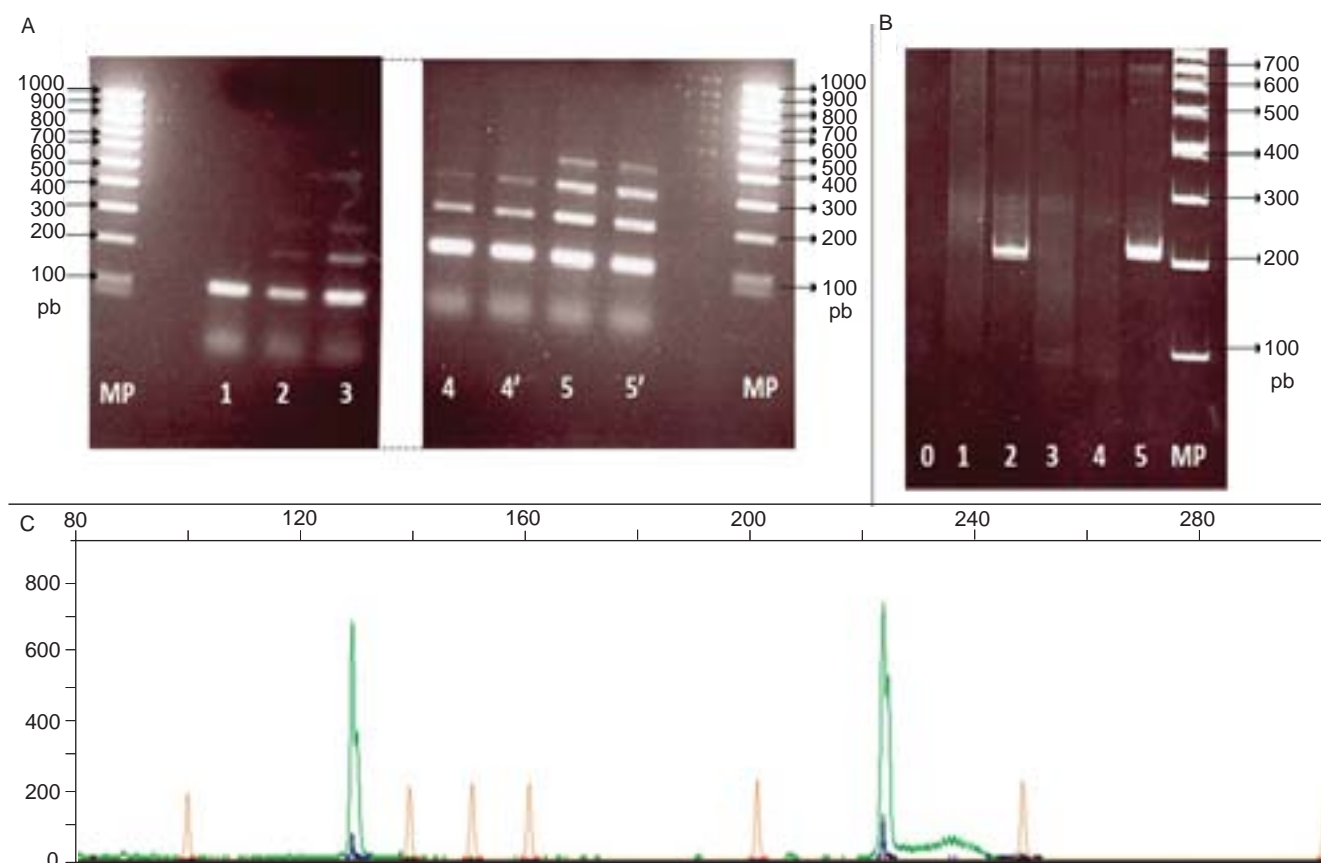


Figura 4. Ejemplos de aplicación de las técnicas de PCR para evaluación de clonalidad linfoide. Control de calidad del ADN por medio de PCR multiplex en electroforesis en gel de acrilamida al 4 % (BIOMED-2). MP = marcador de peso 100 pb; 1 = caso 1, tejido FFEP; 2 = caso 2, tejido FFEP; 3 = caso 3, tejido FFEP; 4 = tejido fresco congelado; 5 = sangre. Electroforesis en gel de acrilamida al 4 % de producto de PCR multiplex BIOMED-2 para TCR-Gamma Tubo B. 0 = agua; 1 = linfocitos; 2 = caso 1; 3 = caso 2; 4 = caso 3; 5 = control positivo; MP = marcador de peso 100 pb. Análisis de fragmentos por medio del programa genescan 4.0 del producto de amplificación del tubo c para evaluar rearrreglos del TCR gamma (BIOMED-2). En la gráfica solo aparece el control + (Mezcla de células Jurkat y Peer).

o productos múltiples. En el caso de muestras que contienen escasos linfocitos, pueden obtenerse picos únicos no específicos, lo cual se denomina pseudo-clonalidad. Además los tejidos, incluso los tumorales, suelen tener un fondo policlonal normal, el cual, en caso de ser muy prominente, podría ser de difícil interpretación.

Los falsos negativos ocurren por varias razones:

1. Se utilizan *primers* o iniciadores consenso; entonces, se amplifican alrededor del 80 % de los posibles segmentos, pero no todos.
2. En las neoplasias de células B maduras del centro germinal, cuyas células pueden haber sufrido hipermutación somática, no habrá amplificación.
3. La lesión está insuficientemente representada en el tejido examinado.⁴

La detección de uno o varios clones no implica la presencia de una neoplasia, razón por la cual insistimos en

que los resultados deben interpretarse en colaboración con todas las disciplinas relacionadas con el paciente.¹⁷ Es posible recurrir a los servicios de EuroClonality para la interpretación de resultados confusos.¹¹

Aunque en México y América Latina algunos grupos tienen experiencia con la utilización de las técnicas, esta sigue siendo relativamente marginal.^{26,27,28,29}

Enfermedad mínima residual y reordenamientos

Los tratamientos actuales para las neoplasias no erradicar, sino que reducen el número de células tumorales.³⁰ Con el fin de predecir y evitar una recaída clínica, se requiere detectar los blastos en fases subclínicas, lo cual se conoce como enfermedad mínima residual (EMR). Esta es un factor pronóstico importante en leucemias y linfomas. Sirve como seguimiento y para determinar la necesidad de trasplante.^{31,32,33}

Cuadro II Rearreglos comunes en linfoproliferaciones

Tipo de enfermedad		Leucemia prolinfocítica- <i>T</i>		Leucemia linfocitos <i>T</i> grandes granulares		Linfoma de células <i>T</i> periférico, inespecífico		Linfoma angioinmunoblástico de células <i>T</i>		Linfoma anaplásico de células largas (ALK+)		Linfoma anaplásico de células largas (ALK -)	
		%		%		%		%		%		%	
TCRB	No rearreglo	-	0	+	4	+	2	+	11	+	26	+	22
	Dβ-Jβ	+	6	+	11	+	13	+	19	+	6	-	0
	Vβ-Jβ	+	94	+	86	+	85	+	70	+	68	+	78
TCRG	No rearreglo	+	6	+	4	+	6	+	8	+	29	+	11
	Vγ9 (+Vγ10/11)	+	9	+	21	+	11	+	5	+	6	+	11
	Vγ10/11	+	15	+	7	+	15	+	19	+	19	-	0
	Vγ11	+	70	+	68	+	68	+	68	+	59	+	78
TCRD	No rearreglo	+	94	+	71	+	85	+	65	+	88	+	100
	Al menos 1 rearreglo TCRD	+	6	+	29	+	15	+	35	+	12	-	0
IGH	No rearreglo	+	91	+	100	+	91	+	70	+	97	+	100
	DH - JH	+	3	-	0	+	4	+	11	-	0	-	0
	VH - JH	+	3	-	0	+	4	+	19	-	0	-	0
IGK	No rearreglo	+	97	+	96	+	98	+	81	+	100	+	100
	Kappa	+	3	-	0	-	0	+	11	-	0	-	0
	Vκ- Jκ	+	3	+	4	+	2	+	19	-	0	-	0
IGL	No rearreglo	+	97	+	96	+	100	+	95	+	100	+	97
	VL- JL	+	3	+	4	-	0	+	5	-	0	-	2

a. Rearreglos frecuentes en linfoproliferaciones *T*

Tipo de enfermedad		Linfoma de células del manto		Leucemia linfocítica crónica		Linfoma folicular		Linfoma de la zona marginal (extranodal)		Linfoma de la zona marginal (nodal)		Linfoma difuso de células B largas	
		%		%		%		%		%		%	
IGH	No rearreglo	-	0	-	0	+	14	+	6	-	0	+	15
	V-D-J	+	100	+	100	+	84	+	84	+	100	+	79
	D _H -J _H	+	11	+	43	+	19	+	58	+	30	+	30
	IGH VDJ + D _H	+	100	+	100	+	86	+	94	+	100	+	85
IGK	No rearreglo	-	0	-	0	+	16	+	16	+	20	+	20
	V _K -J _K	+	94	+	94	+	63	+	68	+	70	+	61
	V _K -kde/intronRSS	+	75	+	61	+	59	+	52	+	60	+	58
	Total IGK	+	100	+	100	+	84	+	84	+	80	+	80
IGL	No rearreglos	+	56	+	70	+	79	+	31	+	70	+	72
	V _λ -J _λ	+	44	+	30	+	30	+	29	+	30	+	28
Rearreglos no funcionales	D _H -J _H +kde	+	78	+	73	+	64	+	71	+	60	+	72
Genes Ig combinados	V _H -J _H + IGK	+	100	+	100	+	100	+	94	+	100	+	96
	IGH + IGK	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	98
	IGH + IGK + IGL	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	98
TCRB	Vβ-Jβ	+	6	+	14	+	3	+	10	+	10	+	13
	Dβ-Jβ	+	6	+	18	+	4	+	19	+	30	+	16
	Total TCRB	+	9	+	25	+	6	+	23	+	10	+	21
TCRG	Total TCRG	+	11	+	18	+	2	+	16	+	10	+	15
TCRD	Total TCRD	+	4	+	12	+	5	+	10	+	20	+	14

b. Rearreglos frecuentes en linfoproliferaciones B

La finalidad de las pruebas para determinación de EMR es detectar hasta el último blasto (cuadro II). Cuando la enfermedad se asocia con un daño genético específico, este puede utilizarse como marcador de EMR. Sin embargo, en algunos casos, como el del transcrito TEL-AML1, la mayoría de los afectados presentan remisión molecular luego de la inducción; al contrario, en el caso del BCR-ABL, la mayoría de los pacientes persisten positivos después de la inducción.³⁴

En el caso de las leucemias, la inmunofenotipificación por medio de CF y las técnicas de biología molecular para la determinación de reordenamientos de los genes del receptor de antígeno ofrecen una elevada sensibilidad. Para determinar EMR por medio de las pruebas de reordenamientos de Ig y TCR, se aplican los protocolos sobre una muestra diagnóstica, rica en células tumorales. Los más representativos se secuencian. A partir de los resultados se diseñan *primers* específicos y se ponen en marcha ensayos cuantitativos por

PCR.³⁵ Un 30 % de los casos presentan evolución clonal y requieren seguimiento por varios rearrreglos.³¹ Sin embargo, puede decirse que el rastreo es, por medio de esta técnica, no solo muy preciso sino personalizado.

Conclusiones

Aunque los procedimientos para confirmar la clonalidad linfóide a partir de la búsqueda de reordenamientos de los genes de receptor de antígeno se conocen y se han utilizado por decenios, es necesario que se extienda su uso y se establezcan intercambios entre las disciplinas con el fin de mejorar la atención a los pacientes.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

1. MelGreaves, Carlo C Marley. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481(10762):306-313.
2. Swerdlow SH, Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. Lyon, France: WHO 2008.
3. Elaine S. Jaffe NLH, James Vardiman, Elias Campo, Daniel MD Arber. Hematopathology. First Edition. Maryland, USA: El sevier 2010.
4. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FI, et al. Design and standarization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
5. Perfetti V, Brunetti L, Biagi F, Ciccocioppo R, Bianchi PI, Corazza GR. TCRβ clonality improves diagnostic yield of TCRγ clonality in refractory celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2012;46(8):675-679.
6. Sirsath NT, Channaviriappa L, Nagendrappa LK, Dasappa L, Sathyanarayanan V, Setty GB. Human immunodeficiency virus - associated lymphomas: a neglected domain. *N Am J Med Sci* 2013;5(7):432-437.
7. Abbas AK. INMUNOLOGÍA celular y molecular. Ninth Edition. San Francisco, USA: El Sevier; 2009.
8. Giallourakis CC, Franklin A, Guo C, Cheng HL, Yoon HS, Gallagher M, et al. Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(51):22207-22212.
9. Deriano L, Chaumeil J, Coussen M, Multani A, Chou YF, Alekseyenko AV, et al. The RAG2 C-terminus suppresses genomic instability and lymphomagenesis. *Nature*. 2011;471(7336):119-123.
10. Knowles II DM, Neri A, Pelicci PG, Burke JS, Wu A, Winberg CD, et al. Immunoglobulin and T-cell-receptor B-chain gene rearrangement analysis of Hodgkin's Disease: Implications for late age determination and differential diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(1):7942-7946.
11. EuroClonality. EuroClonality 2013 (consultado 2013 Oct 10). Disponible en <http://www.euroclonality.org/>.
12. Invivoscribe. Invivoscribe | Personalized Molecular Medicine 20 (consultado 2013 Oct 28). Disponible en <http://www.invivoscribe.com/>.
13. Melotti CZ, Carriel MF, Sotto MN, Diss T, Sanches JA. Polymerase Chain Reaction-Based Clonality Analysis of Cutaneous B-Cell Lymphoproliferative Processes. *Clinics* 2010;65(1):53-60.
14. Susan Harris, M Brüggemann, P. J. T. A Groenen, E. Shuuring, A. W. Langerak, E. Hodges. Clonality analysis in lymphoproliferative disease using the BIOMED-2 multiplex PCR protocols: experience from the EuroClonality group EQA scheme. *Journal of Hematopathology* 2012;5(1-2):91-98.
15. Van den Beemd R, Boor PP, Van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, et al. Flow cytometric analysis of the Vβ repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000;40(4):336-345.
16. Kalina T, Flores-Montero J, Van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26(9):1986-2010.
17. J. Han van Krieken, Jose Cabecadas, Patricia J, Groenen TA. Clonality testing: teamwork by pathologist and molecular biologist. *Journal of Hematopathology* 2012;5(1-2):3-5.

18. Irina Bonzheim, Florian Frölich, Patrick Adam, Sema Colak, Gisela Metzler, Falko Fend, et al. A comparative analysis of protocols for detection of T cell clonality in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: implications for practical use. *Journal of Hematopathology* 2012;5(1-2):7-16.
19. Paireder S, Werner B, Bailer J, Werther W, Schmid E, Patzak B, et al. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem* 2013;2(439):452-460.
20. Van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007;21(2):201-206.
21. Medeiros LJ, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(12):1189-1207.
22. K. M. Hebeda, M.C. Van Altena, P. Rombout, J.H.J. M. Van Krieken, P. J. T. A. Groenen. PCR clonality-detection in Hodgkin lymphoma. *Jornal of Hematopathol* 2013:34-41.
23. Beaufils N, Ben Lassoued A, Essaydi A, Dales JP, Formisano-Tréziny C, Bonnet N, et al. Analysis of T-cell receptor- γ gene rearrangements using heteroduplex analysis by high-resolution microcapillary electrophoresis. *Leuk Res* 2012;36(9):1119-1123.
24. Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007;21(2):207-214.
25. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012;26(10):2159-2171.
26. Ortiz YM, Arias L, Alvarez CM, García LF. Memory phenotype and polyfunctional T cells in kidney transplant patients. *Transpl Immunol* 2013;28(3):127-137.
27. Piña-Oviedo S, Fend F, Kramer M, Fournier F, Farca A, Ortiz-Hidalgo C. Diagnosis of early gastric marginal zone lymphoma (MALT lymphoma) in endoscopic biopsies. Report of a case that demonstrates the utility of immunohistochemistry and the molecular analysis. *Rev Gastroenterol Mex* 2008;73(3):172-176.
28. Stefanoff CG, Hassan R, Gonzalez AC, Andrade LA, Tabak DG, Romano S, et al. Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 2003;12(2):79-87.
29. Andrea Bosaleh, Valeria Denninghoff, Alejandro García, Carla Rescia, Alejandra Avagnina, Boris El-sner. Rearreglos de genes de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en las gammopatías monoclonales. *Scielo* 2005;65(1):229-225.
30. Quesnel B, Preudhomme C. Residual disease: the hematologist's point of view. *Bull Cancer.* 2001;88(6):571-575.
31. Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, et al. Flow cytometry and Ig/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantification in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter-prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia* 2013;27(2):370-376.
32. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet.* 1998;352(9142):1731-1738.
33. Cavé H, Van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med* 1998;339(9):591-598.
34. Weng XQ, Shen Y, Sheng Y, Chen B, Wang JH, Li JM. Prognostic significance of monitoring leukemia-associated immunophenotypes by eight-color flow-cytometry in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* 2013;16(3):133-143.
35. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010;24(3):521-535.