

CÁPSULAS EN MEDICINA DE LABORATORIO

www.traineecouncil.org

TÍTULO: Genética de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T

PONENTE: Bing Melody Zhang

Diapositiva 1:

Hola, mi nombre es Bing Melody Zhang. Soy Profesor Asistente (clínico) de Patología en la Universidad de Stanford. Bienvenido a esta Cápsula en Medicina de Laboratorio sobre la "Genética de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T".

Diapositiva 2:

Aquí se muestra el esquema de esta charla. Cubriré la estructura y la genética de inmunoglobulinas (Ig) y el receptor de células T (TCR), el desarrollo de células T/B y reordenamientos del gen TCR/Ig, las pruebas moleculares y la utilidad clínica del análisis de reordenamiento de TCR/Ig.

Diapositiva 3:

Primero revisemos la estructura de las inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de células T (TCR).

Los linfocitos B y T se caracterizan por sus receptores antígeno específicos, que son las moléculas efectoras primarias del sistema inmunitario adaptativo. Para las células B, existe la forma unida a la membrana de la inmunoglobulina como componente principal del receptor de células B (BCR) y la forma soluble de la inmunoglobulina (Ig) secretada por las células plasmáticas. Ambas formas de la inmunoglobulina (Ig) tienen la misma estructura en forma de Y, compuesta por 2 cadenas pesadas y 2 ligeras.

Por otro lado, los receptores de células T son moléculas heterodiméricas presentes en la superficie celular y son los responsables de reconocer los antígenos presentados a las células T en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En la circulación, la mayoría de las células T (95%) expresan cadenas alfa beta y una minoría de las células T expresan cadenas gamma-delta, como parte del complejo TCR. Las células T gamma-delta son un subtipo dominante de células T que se encuentran en los tejidos epiteliales.

Tanto las moléculas de TCR como las inmunoglobulinas (Ig) constan de regiones variables y constantes. Cada receptor de linfocitos tiene una especificidad de antígeno única determinada por la estructura del sitio de unión al antígeno principalmente a partir de las secuencias de aminoácidos variables.

Diapositiva 4:

A nivel genético, existe un mecanismo complejo y elegante para generar el repertorio de receptores de antígenos de linfocitos notablemente diverso y necesario para responder a una gran variedad de antígenos. Cada variante de la cadena del receptor no se puede codificar por completo en el genoma debido al nivel extremadamente alto de diversidad. En cambio, las cadenas de receptores están codificadas en el genoma de la línea germinal en varias partes: como segmentos de genes variable (V), diversidad (D) y unión (J), con cada tipo de segmento génico presente en copias múltiples.

Estos segmentos de genes se ensamblan en el linfocito en desarrollo mediante recombinación aleatoria de ADN somático para formar una secuencia de región variable completa, un mecanismo conocido como reordenamiento de genes. Los segmentos V y J están presentes en todos los genes de receptores de antígenos, y el segmento D está presente solo en algunos. El gran número de posibles combinaciones de diferentes segmentos explica gran parte de la diversidad del repertorio de receptores.

Además, existe una inserción y delección aleatoria de nucleótidos en las regiones de unión por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal. Esto ocurre tempranamente en la ontogenia

linfoide tanto en las células B como en las células T, esencialmente en conjunto con el proceso de reordenamiento, y aumenta aún más la diversidad del repertorio.

Las células B maduras, al encontrarse y activarse por antígenos, pueden extender el repertorio de inmunoglobulinas (Ig) a través de la hipermutación somática, que es una alta tasa de mutaciones puntuales en las regiones V de los genes de inmunoglobulinas (Ig).

Diapositiva 5:

Como se muestra aquí, el proceso de reordenamiento de los genes IGH generalmente inicia con un reordenamiento de D a J seguido de un reordenamiento de V a D – J. El mismo proceso se aplica a los genes TCR Beta (TRB) y TCR delta (TRD).

Los genes de la cadena ligera de Ig (IGK, IGL), TCR alfa (TRA) y TCR gamma (TRG) no contienen segmentos del gen D, y sus reordenamientos implican recombinaciones directas de V a J.

Diapositiva 6:

El proceso de reordenamiento de inmunoglobulinas (Ig) generalmente inicia con la unión de D a J seguida de la unión de V a D-J en el caso de un gen de cadena pesada (IGH), o unión directa de V a J en caso de los genes de cadena ligera kappa (IGK) y lambda (Genes IGL). Las secuencias entre los segmentos de genes que se reorganizan generalmente se eliminan.

El reordenamiento del gen del receptor de antígeno es un proceso propenso a errores y algunos reordenamientos dan como resultado genes no funcionales. En el caso de IGH, si falla el reordenamiento del primer alelo, se reordena el segundo alelo. Una sola célula B puede tener dos reordenamientos IGH diferentes. Los genes IGK se reorganizan de manera similar solo después de la reordenación exitosa del gen IGH. En la mayoría de los casos, los genes IGL se reorganizan solo si fallan los reordenamientos de los genes IGK y se eliminan ambos alelos. Las células B normales que no producen un IGH funcional o un reordenamiento de la cadena ligera suelen sufrir apoptosis.

Diapositiva 7:

Las células T se desarrollan a partir de células progenitoras linfoides comunes que migran al timo desde la médula ósea o el hígado fetal. Los linfocitos T diferenciadores en el timo son doble negativo (DN), doble positivo (DP) o simple positivo (SP) para la expresión de antígenos de superficie celular CD4 y CD8. Durante la etapa doble negativa (DN), las células T se pueden subdividir en cuatro subconjuntos (DN1-4), según el reordenamiento de sus genes TCR y la expresión de antígenos de superficie.

Los reordenamientos del gen TCR son más complejos y generalmente siguen un orden jerárquico. Primero se reordenan los genes de la cadena TCRD (TRD), luego los genes de la cadena TCRG (TRG), lo que potencialmente da como resultado la expresión de TCR $\gamma\delta$; o seguido de un reordenamiento del gen de la cadena de TCRB (TRB) adicional y una delección de TRD con un reordenamiento del gen de la cadena de TCRA (TRA) posterior, potencialmente seguido por la expresión de TCR $\alpha\beta$.

Diapositiva 8:

En la tabla se muestra el número estimado de segmentos génicos humanos funcionales y reordenables V, D y J implicados en los reordenamientos del gen TCR/Ig.

Las múltiples combinaciones de segmentos génicos V, D y J representan el llamado repertorio combinatorio, que se estima en 2×10^6 para moléculas de inmunoglobulinas (Ig), 3×10^6 para moléculas de TCR $\alpha\beta$ y 5×10^3 para moléculas de TCR $\gamma\delta$.

Diapositiva 9:

Hemos hablado de la genética de los reordenamientos del receptor de antígeno de linfocitos. ¿Cómo sería útil esta información en el diagnóstico de neoplasias linfoides?

Las neoplasias son poblaciones de células que, en teoría, se derivan de la proliferación de una única célula precursora común y, por lo tanto, se esperaría que contuvieran secuencias de ADN idénticas que podrían utilizarse como marcadores tumorales específicos. Los reordenamientos clonales de IGH e IGK pueden detectarse esencialmente en todas las neoplasias malignas de

células B maduras, pero muchas neoplasias malignas de células B precursoras solo tendrán reordenamientos de IGH, ya que la transformación maligna ocurre antes del reordenamiento de los genes de la cadena ligera.

Se han observado reordenamientos de las cadenas TCRB y / o TCRG en casi todos los tipos de trastornos linfoproliferativos T. Sin embargo, existen neoplasias raras de células T que carecen de reordenamientos de los genes TRB o TRG, y en estos casos, la evaluación de TRD podría ser útil.

Aunque el análisis de los reordenamientos del gen del receptor de antígeno puede proporcionar una herramienta de laboratorio de diagnóstico útil para la determinación del linaje, no son necesariamente específicos del linaje y pueden producirse reordenamientos de linaje cruzado. Además, la clonalidad no equivale a malignidad: las condiciones benignas y reactivas pueden producir patrones clonales debido a expansiones de linfocitos impulsadas por antígenos (Ag). Por lo tanto, los resultados siempre deben interpretarse dentro del contexto clínico apropiado y con los hallazgos morfológicos.

Diapositiva 10:

Entonces, ¿qué métodos de diagnóstico molecular podemos usar para probar los reordenamientos de TCR/Ig en el laboratorio?

En el pasado, se utilizaban técnicas de Southern blot, y el método empleado actualmente por la mayoría de los laboratorios es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis capilar. Con los avances en la tecnología de secuenciación, algunos laboratorios han realizado la transición al método basado en secuenciación de próxima generación. Presentaré cada uno de estos métodos con más detalle en las próximas diapositivas.

Las aplicaciones de las pruebas de reordenamiento de TCR/Ig incluyen análisis de clonalidad y evaluaciones de enfermedades residuales mínimas.

Diapositiva 11:

En el pasado, la clonalidad se estudiaba principalmente mediante la técnica de laboratorio de Southern blot, que solían considerarse como el estándar de oro para tales pruebas. Este método generalmente aprovecha los repertorios combinatorios de genes TCR/Ig para detectar reordenamientos genéticos basados en un conjunto reproducible de fragmentos de ADN generados por una enzima de restricción específica.

Para realizar este tipo de pruebas, es necesario digerir el ADN de alto peso molecular con enzimas endonucleasas de restricción y someterlo a electroforesis durante la noche en gel de agarosa para separar los fragmentos de ADN. A continuación, estos fragmentos se transfieren e hibridan con sondas de ADN marcadas y homologas a los genes diana. Se detecta una banda marcada claramente visible cuando está presente el reordenamiento del gen clonal.

Este método genera menos resultados positivos falsos en comparación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, existen desventajas inherentes al Southern blot, tales como: sensibilidad limitada, demandas significativas de tiempo y habilidad técnica, la necesidad de grandes cantidades de ADN de alta calidad, tiempo de respuesta más largo y no es adecuado para el rastreo de clones.

Diapositiva 12:

En comparación con Southern blot, el método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es más rápido y preciso y solo requiere pequeñas cantidades de ADN como base.

Además, la PCR también puede amplificar ADN parcialmente degradado. Por lo tanto, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden utilizar para analizar pequeñas biopsias (por ejemplo, biopsias de piel) o muestras incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE), que generalmente producen ADN de baja calidad.

Se utilizan dos tipos diferentes de análisis de PCR para las evaluaciones del reordenamiento del gen TCR/Ig: cualitativo y cuantitativo. Los ensayos cualitativos son adecuados para la evaluación de la clonalidad y no permiten un análisis de MRD preciso. Los productos de ampliación (amplicones) de PCR generados usando cebadores específicos de TCR/Ig, se someten a

electroforesis capilar para ser separados por tamaño. La interpretación de la clonalidad se basa en el patrón de distribución del tamaño de los fragmentos. En esta diapositiva se muestran patrones monoclonales y policlonales representativos.

Los enfoques cuantitativos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son importantes para evaluar las respuestas al tratamiento y monitorear la enfermedad residual mínima (ERM), antes de la disponibilidad de las pruebas basadas en la secuenciación de nueva generación (del inglés, *next generation sequencing-NGS*).

Diapositiva 13:

El análisis de reordenamiento de genes TCR/Ig utilizando tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) comenzó a estar disponible en los laboratorios de diagnóstico molecular clínico en los últimos años. En comparación con el método basado en PCR/electroforesis capilar (CE), el método basado en la secuenciación de nueva generación (del inglés, *next generation sequencing NGS*) puede proporcionar la caracterización de la huella digital de cada clonotipo, es decir, la secuencia reordenada específica, así como la información de recuento de secuenciación cuantitativa. Puede mejorar la sensibilidad y la especificidad de la prueba en comparación con el método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La prueba se puede realizar fácilmente en secuenciadores de sobremesa con capacidad para multiplexar varias muestras en la misma corrida.

Diapositiva 14:

A continuación, se enumeran algunas de las principales utilidades clínicas del análisis de reordenamiento del gen TCR/Ig molecular en neoplasias linfoides.

Puede ayudar al diagnóstico de casos difíciles o no concluyentes de trastornos linfoproliferativos, la evaluación de la relación clonal entre dos o más lesiones en el mismo paciente, la discriminación entre una recaída y una segunda neoplasia, la estadificación del linfoma y monitoreo/evaluación de la eficacia del tratamiento.

Diapositiva 15:

Para resumir los puntos principales de esta cápsula:

Los genes TCR/Ig están codificados en el genoma de la línea germinal como diferentes segmentos génicos. Durante el desarrollo de las células T/B, los segmentos de los genes V, (D) y J se someten a una recombinación aleatoria para formar una secuencia completa, conocida como reordenamiento del gen TCR/Ig.

Las inserciones y deleciones de nucleótidos adicionales no emplazados en las regiones de unión durante los reordenamientos de genes, así como las hipermutaciones somáticas en los genes de Ig, aumentan aún más la diversidad del repertorio de TCR/Ig.

El análisis molecular de los reordenamientos del gen TCR/Ig tiene una utilidad clínica importante en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias linfoides.

Diapositiva 16: Títulos de las figuras y tablas

Diapositiva 17: Referencias

Diapositiva 18: Declaraciones

Diapositiva 19: Gracias en nombre de www.TraineeCouncil.org

Gracias por acompañarme en esta Cápsula en Medicina de Laboratorio sobre “Genética de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T”