



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INMUNO-TIPIFICACIÓN DE DEPÓSITOS TISULARES
AMILOIDES DE CADENAS LIGERAS DE INMUNOGLOBULINAS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JOSÉ FRANCISCO CHANDOMÍ VÁZQUEZ

DR. LUIS DEL POZO YAUNER
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	4
I. MARCO TEÓRICO	5
Las proteínas, actores fundamentales de la biología celular.....	5
La agregación de las proteínas como fuerza evolutiva.	6
Las amiloidosis.	7
Agregación amiloide como consecuencia del plegamiento incorrecto de las proteínas.....	8
El estado amiloide.	9
Características clínicas generales de las amiloidosis.....	11
Amiloidosis por cadena ligera (AL).	14
Epidemiología de la amiloidosis AL	15
Características clínicas de la amiloidosis AL.....	16
Diagnóstico de la amiloidosis AL.	18
Anticuerpos.....	20
Características estructurales de las cadenas ligeras de anticuerpos.....	22
Diversidad estructural de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas.	23
Contribución de las mutaciones somáticas a la deposición amiloide de las cadenas ligeras.	24
Contribución de los isotipos κ y λ y los segmentos de genes VL a la agregación amiloide.	25
Papel de otros factores en la agregación amiloide de las cadenas ligeras.....	27
La proteína 6aJL2 como un modelo de estudio de agregación amiloide	28
Las proteínas como antígenos.	29
Anticuerpos anti-péptidos.	31
Uso de anticuerpos en el estudio de las amiloidosis.	33
Desarrollo de un sistema diagnóstico.....	35
Validación de biomarcadores.....	35
Disponibilidad, estabilidad, especificidad y reactividad cruzada de los anticuerpos como reactivos.....	36
Antecedentes.....	37
II. JUSTIFICACIÓN.....	41
III. HIPOTESIS.....	42
IV. OBJETIVOS.....	42
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
Selección de las secuencias para la producción de los anticuerpos policlonales....	43
Producción de policlonales.	44

Producción de anticuerpos monoclonales.	45
1. Inmunización.	45
2. Fusión de células de bazo y células de mieloma.	45
3. ELISA para la detección de anticuerpos.	47
4. Clonación.	48
Selección de secuencias de proteínas amiloidogénicas.	48
Transformación de construcciones de rVL amiloidogénicos en células de E. coli BL21(DE3).	49
Preparación de glicerol para almacenar las células transformadas con las construcciones de los rVL.	50
Expresión y purificación de los rVL de cadenas ligeras amiloidogénicas.	51
Experimento de fibrilogénesis in vitro.	52
Modelo murino de amiloidoma.	52
Dot-Blot.	53
VI. RESULTADOS.	54
Expresión y purificación de los rVL de cadenas ligeras amiloidogénicas.	54
Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos policlonales a cadenas ligeras amiloidogénicas $\lambda 6$	54
Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos policlonales en cortes de un amiloidoma generado en un modelo murino.	57
Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales.	58
VII. DISCUSIÓN.	59
VIII. PERSPECTIVAS.	62
IX. CONCLUSIONES.	63
REFERENCIAS.	64

RESUMEN

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades caracterizadas por la deposición extracelular de agregados fibrilares insolubles de naturaleza proteica. Mas de una treintena de proteínas han sido identificadas como capaces de formar agregados fibrilares en humanos. La amiloidosis AL es una amiloidosis sistémica causada por la deposición de cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Segmentos dentro de las proteínas han sido identificados como importantes dentro de la cinética de agregación de las proteínas precursoras, ya sea como regiones propensas a sufrir cambios conformacionales o como motivos protectores de la agregación. Anticuerpos policlonales y monoclonales han sido utilizados como herramientas para el estudio de estos segmentos en una proteína modelo, 6aJL2.

En el presente trabajo se exploró la posibilidad de emplear anticuerpos policlonales para distinguir cadenas ligeras derivadas de distintas líneas germinales. Se llevaron a cabo ensayos de dot-blot para determinar la especificidad de los policlonales. Se generó un modelo murino de amiloidosis para probar los anticuerpos en muestras de origen biológico. Se trabajó también en la generación de anticuerpo monoclonales con el objetivo de obtener un reactivo más homogéneo y específico; sin embargo, no se llegaron a obtener anticuerpos monoclonales capaces de reconocer la proteína modelo.

I. MARCO TEÓRICO

Las proteínas, actores fundamentales de la biología celular.

Las proteínas desempeñan un papel clave en el sostenimiento de la vida debido a que son las encargadas de traducir en acciones moleculares específicas la información contenida en el genoma. Para cumplir con tan compleja tarea, las proteínas disponen de la mayor diversidad de secuencia y estructura tridimensional entre todas las biomacromoléculas que componen los sistemas biológicos (1).

Tanto en el compartimiento intracelular como en el extracelular, la mayoría de las proteínas ejercen su función en estado soluble, ya sea como monómeros independientes o como parte de complejos multimoleculares, cuya composición está definida en la información genética. La función de las proteínas depende de la adopción de una conformación tridimensional denominada plegamiento nativo, o estructura nativa, caracterizada por una organización topológica específica de la cadena polipeptídica que resulta generalmente en una estructura compacta. La estructura nativa está determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína y es suficientemente estable en las condiciones fisiológicas como para permitir que la proteína cumpla sus funciones (2, 3). La estabilidad de la estructura nativa resulta del conjunto de las interacciones que se establecen entre los residuos de aminoácidos de la proteína, unos con otros y con las moléculas del solvente (4, 5). En algunos casos, la estabilidad también depende de las interacciones que establece la proteína con ligandos que contribuyen a su función, los cuales pueden ser tan pequeños como iones, o moléculas constituidas por unos pocos átomos, o péptidos medianos y otras proteínas (6, 7). Adicionalmente, la estabilidad de la estructura nativa también va a depender de cómo este modifica la entropía de la proteína misma, así como de las moléculas del solvente (8).

La agregación de las proteínas como fuerza evolutiva.

El mecanismo a través del cual las proteínas desempeñan sus funciones es el reconocimiento molecular (9), el cual implica la interacción física de la molécula de proteína con otra, u otras moléculas, a través de superficies de complementariedad espacial y de carga. La especificidad de la interacción va a depender de la posición espacial y la naturaleza química de los grupos atómicos situados en la interfase de interacción, lo cual es una función de la estructura primaria de la proteína. La interacción funcional entre la proteína y su(s) ligando(s) específico(s) es estabilizada por numerosas uniones débiles, no covalentes, de naturaleza diversa, como las fuerzas de van der Waals(10), los puentes de hidrógeno, los enlaces salinos y las interacciones hidrofóbicas (11, 12). Sin embargo, estas mismas fuerzas que median el reconocimiento molecular y la función normal de las proteínas, también pueden mediar interacciones intermoleculares inespecíficas, o espurias, que promueven la agregación. Esto explica por qué en ciertas circunstancias, las proteínas muestran tendencia a agregarse, poniendo en riesgo la viabilidad de la célula, dada la capacidad de los agregados de alterar sus procesos vitales (13-15). La necesidad de prevenir la agregación de las proteínas ha constituido unas de las fuerzas que ha “empujado” la evolución de los sistemas biológicos, “*esculpiendo*” la secuencia de las proteínas hasta llegar a como las conocemos hoy (14, 16-21). Varios son los mecanismos desarrollados por los sistemas biológicos para contender con la agregación de las proteínas. Algunos de estos mecanismos operan en los diversos espacios del compartimiento celular (22, 23), mientras otros son activos en el espacio extracelular (24). Una de las funciones de estos mecanismos es asistir a las proteínas de nueva síntesis en el proceso de plegamiento, evitando así que se agreguen durante el mismo (22). Otra función es eliminar, mediante proteólisis, las proteínas que, por alguna razón, perdieron su plegamiento nativo, condición que favorece la agregación (22, 25). Trabajando de forma conjunta y complementaria, estos mecanismos preservan la proteostasis celular, que es la condición en la que cada proteína del proteoma conserva su plegamiento nativo funcional y alcanza la localización celular/tisular y concentración requeridos para el funcionamiento

normal de la célula en un momento biológico definido (26). Conservar la proteostasis celular requiere un delicado balance entre los procesos de síntesis y plegamiento de proteínas, su modificación postraducciona l y localización subcelular, y la posterior degradación cuando ya cumplieron su función(26-28). Cuando el balance entre estos procesos se rompe, el resultado es la acumulación de proteínas envejecidas, químicamente modificadas y con plegamiento no nativo, lo que incrementa el riesgo de agregación, con la consiguiente alteración de la biología celular y la muerte, si la proteostasis no puede ser restituida (13-15).

Las proteínas forman diferentes tipos de agregados que causan enfermedades en los humanos. Tanto las propiedades patogénicas, como las características morfológicas y estructurales de los agregados varían ampliamente, dependiendo de la proteína implicada. Uno de los tipos de agregados patológicos que las proteínas pueden formar es el amiloide, el cual está íntimamente relacionado con un grupo diverso de enfermedades conocidas como amiloidosis.

Las amiloidosis.

Las amiloidosis son un conjunto clínicamente heterogéneo de enfermedades crónico-degenerativas, caracterizadas por la deposición, en el espacio extracelular, de una sustancia denominada genéricamente “amiloide” (29-32). En los depósitos de amiloide se reconocen dos componentes principales, uno fibrilar, específico de cada enfermedad, y otro no fibrilar, común a todas las amiloidosis (29, 31, 33). El componente fibrilar, como su nombre lo indica, consiste en agregados de aspecto fibrilar al microscopio electrónico, compuesto de una proteína o péptido específico de cada amiloidosis. Se han identificado alrededor de 30 proteínas y péptidos diferentes que pueden formar amiloide in vivo, a los cuales se les denomina “*precursores de amiloide*” (29, 31-34) (Tabla 1). Es importante mencionar que, si bien los precursores de amiloides forman agregados de morfología y propiedades biofísicas similares, no comparten similitud significativa en cuanto a secuencia y estructura tridimensional (35) (Figura 1). Por otra parte, el componente no fibrilar,

asociado íntimamente con las fibras, consiste en un grupo de moléculas de naturaleza diversa que se denominan “*componentes accesorios del amiloide*” (36). Dentro de este grupo destacan, entre otros, la apolipoproteína E (ApoE) (37-39), el componente P sérico del amiloide (SAP)(39), el cual es una glicoproteína que pertenece a la familia de las pentraxinas (40), y los glucosaminoglicanos (41). Se cree que el componente no fibrilar del amiloide influye significativamente en las propiedades patogénicas de los depósitos, así como en su inmunogenicidad y estabilidad física (36).

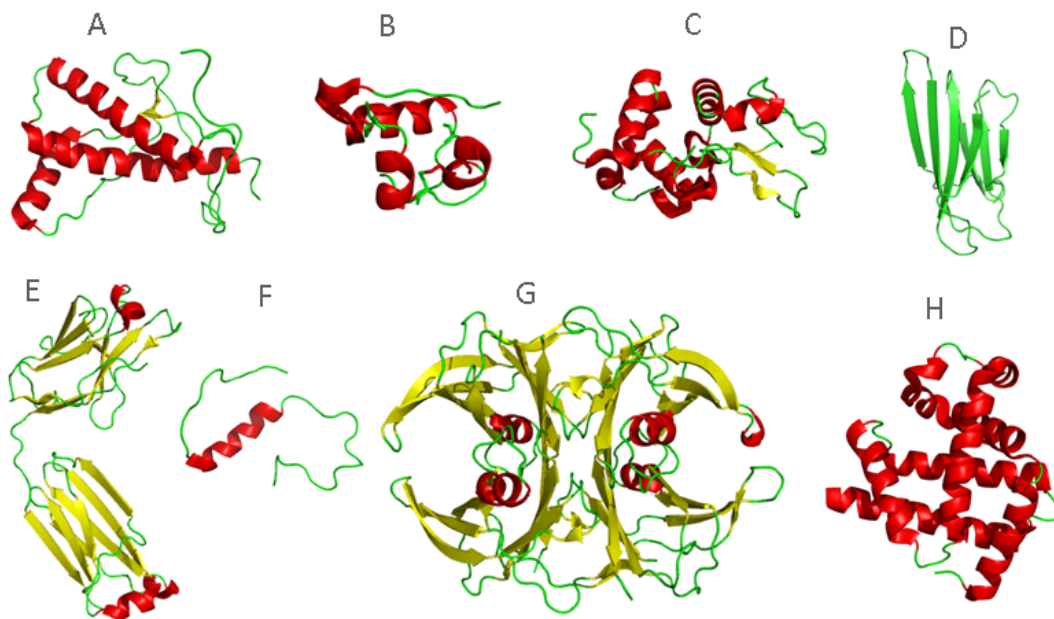


Figura 1. Diversidad estructural de precursores amiloides humanos. Representaciones de la estructura tridimensional de A) variante protectora E219K de la proteína prion (PDB ID 2LSB), B) insulina (PDB ID 2C8Q), C) lisozima (PDB ID 1IWT), D) $\beta 2$ microglobulina (PDB ID 2F8O), E) cadena ligera de inmunoglobulinas tipo lambda (PDB ID 3WHE), F) péptido A β (1-40) en ambiente acuoso (PDB ID 2LFM), G) la altamente amiloidogénica transtiretina mutante G53S/E54D/L55S (PDB ID 1G1O). En H) estructura cristalográfica de la mioglobina humana mutación K45R (PDB ID 3RGK).

Agregación amiloide como consecuencia del plegamiento incorrecto de las proteínas.

Abundante evidencia acumulada en las últimas tres décadas claramente indican que la agregación amiloide de las proteínas ocurre mediante la pérdida total, o parcial de la estructura nativa. Estos estudios también han identificado un grupo de factores, algunos dependientes de la proteína misma, y otros del

microambiente tisular, que promueven la formación de amiloide a través de su efecto desestabilizador del plegamiento nativo de las proteínas (13, 15, 34, 42-48). Por ello, las amiloidosis están comprendidas dentro del grupo de las enfermedades por plegamiento incorrecto de las proteínas (49).

Se plantea que, al menos para algunas proteínas y bajo ciertas circunstancias, el estado amiloide representa una condición más estable que el estado nativo, lo cual explicaría la formación espontánea de este agregado, tanto in vivo como in vitro(50). Esta hipótesis supone que el plegamiento nativo de las proteínas es un estado metaestable, separado del estado fibrilar por barreras energéticas que impiden que la proteína alcance el estado amiloide, termodinámicamente más estable (50). Así, la agregación amiloide ocurre cuando el paisaje energético/conformacional accesible a las moléculas de la proteína es modificado por factores, tanto ambientales como relativos a la estructura de la proteína misma, resultando en la disminución de la, o las barreras energéticas que separa el estado nativo del fibrilar. La consecuencia directa es el incremento de la probabilidad de que las moléculas de la proteína adopten formas de plegamiento no nativo que suelen tener tendencia a agregarse (2, 34, 51).

El estado amiloide.

La fibra amiloide madura es una estructura compleja, formada por la asociación de formas fibrilares precursoras, denominadas protofilamentos y protofibrillas, que se ensamblan a través de un proceso jerárquico (52-54). Los datos de microscopía de fuerza atómica han demostrado que, en el caso de las fibras amiloide de cadena ligera de inmunoglobulina, las primeras estructuras fibrilares en formarse son los protofilamentos. Estos se asocian para dar lugar a las “protofibras”, que a su vez se combinan para formar las fibras maduras (55). Se desconoce cómo las fibras amiloides se ensamblan in vivo, si bien este proceso debe estar influido por el ambiente molecular donde ocurre la deposición, así como por las interacciones de la proteína amiloidogénica con las moléculas accesorias del amiloide (36). Es importante mencionar que, al margen de la diversidad estructural que caracteriza a las proteínas

amiloidogénicas (Ver Figura 1), los agregados amiloides que estas forman comparten muchas de sus características ultra-estructurales y propiedades biofísicas. Esto sugiere la presencia de elementos estructurales comunes a todos los amiloides. Es bien conocido que los amiloides se caracterizan por ser agregados fibrilares insolubles, resistentes a la acción de ciertas proteasas y que muestran afinidad por colorantes, como el Rojo Congo y el Tioflavina T(34, 35). Adicionalmente, todos dan lugar a un patrón de difracción de rayos X similar, denominado β -cruzado, el cual se compone de dos reflexiones principales, una ecuatorial a alrededor de 10 Å y otra meridional a 4.7 Å. Este patrón es consistente con un núcleo estructural común a toda fibra amiloide, compuesto por hebras β orientadas perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra, las que se asocian para formar largas hojas β intermoleculares que se extienden a lo largo de la fibra. La reflexión a 4.7 Å está determinada por la distancia entre hebras β contiguas, mientras la reflexión a 10 Å refleja el espaciamiento de hojas β apiladas una sobre otra del núcleo fibrilar (56) (Figura 2).

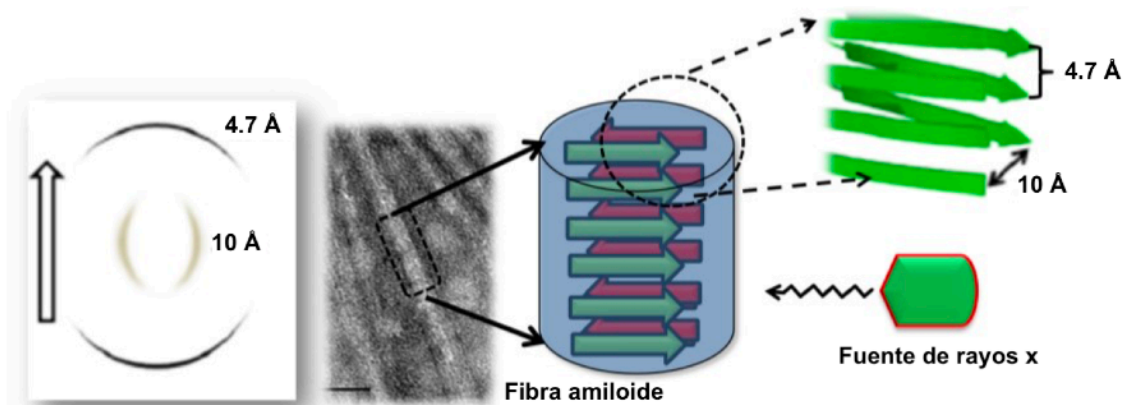


Figura 2. Representación esquemática del patrón de difracción de rayos X β -cruzado típicamente producido por las fibras amiloides. El patrón β -cruzado es consistente con un núcleo formado por extensas láminas β dispuestas a lo largo del eje longitudinal de la fibra, mientras que las hebras β que las forman están dispuestas perpendicularmente. Las reflexiones a 4,7 Å y 10 Å, típicas del patrón de difracción de β -cruzado, reflejan, respectivamente, el espaciado entre hilos y entre hojas que caracterizan la estructura beta cruzada. La flecha blanca en la esquina izquierda indica la orientación relativa del eje longitudinal de las fibrillas con respecto a la posición de los reflejos del patrón.

Se han reportado tres factores que participan de forma independiente o combinada en la formación de agregados amiloides: 1) una propensión intrínseca de la proteína precursora a adoptar una forma de plegamiento no nativo (lo que aumenta con el envejecimiento), 2) la presencia de mutaciones que modifican las propiedades estructurales y fisicoquímicas de la molécula y 3) un remodelado postraduccional aberrante de la proteína precursora, que incluye proteólisis, glicosilaciones y fosforilación en sitios específicos, entre otros (2, 13, 15, 42, 44). La generación de agregados amiloides involucra la formación de contactos intermoleculares, por lo que la amiloidogénesis se ve favorecida a altas concentraciones de la proteína implicada (Figura 3).

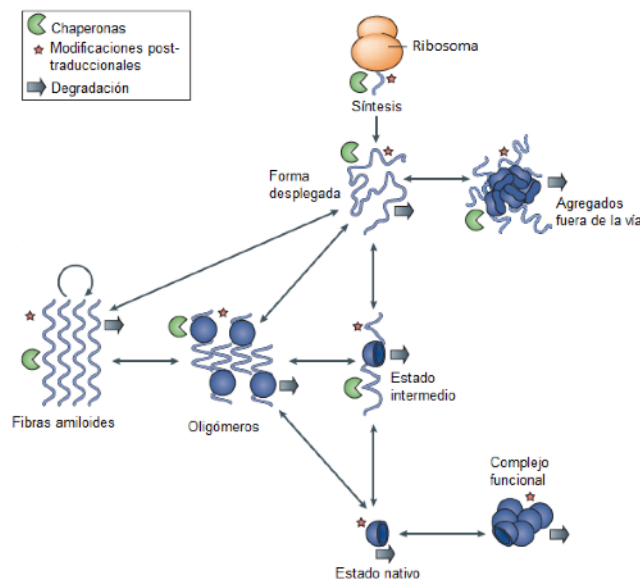


Figura 3. Una proteína puede existir en distintos estados, las distintas poblaciones de una proteína y sus ritmos de inter-conversión están determinadas por su estabilidad termodinámica y con barreras energéticas que están asociadas a los estados de transición, así como a la velocidad de síntesis y degradación. Tomado de Knowles, 2014.

Características clínicas generales de las amiloidosis.

Las amiloidosis se clasifican en sistémicas y localizadas en dependencia del número de órganos o sistemas afectados por la deposición (Tabla 1)(31, 32). Las amiloidosis localizadas, como su nombre indica, afectan a un único

órgano o tejido. Las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las encefalopatías espongiiforme transmisibles, o enfermedades por priones, la enfermedad de Huntington, entre otras, constituyen la forma clásica de amiloidosis localizada, dado que cursan con deposición de amiloide sólo en el sistema nervioso central (57). Por otra parte, las amiloidosis por cadenas ligeras (AL), por transtiretina (ATTR) y por proteína sérica A (AA), son formas clásicas de amiloidosis sistémicas, dado que afectan múltiples órganos y tejidos, si bien la manifestación clínica de la enfermedad suele estar dominada por los signos y síntomas derivados de la disfunción del, o de unos pocos órganos donde la deposición es mayor (30). Vale la pena señalar que estas tres enfermedades son las amiloidosis sistémicas más frecuentes diagnosticadas en los países occidentales (58, 59). La proteína amiloide sérica A es una de las apolipoproteínas asociadas a las lipoproteínas de alta densidad (60). Además, es una proteína de fase aguda asociada a estados inflamatorios crónicos, como la artritis reumatoide, la fiebre familiar del mediterráneo y patologías como el carcinoma renal y el linfoma de Hodgkin (61). La transtiretina, antes conocida como prealbúmina, es una proteína sérica homotetramérica intrínsecamente amiloidogénica, que forma complejos con la proteína transportadora de retinol y la vitamina A (62). En el caso de la amiloidosis AL, como se mencionó antes, la proteína precursora de amiloide es la cadena ligera de los anticuerpos (63). Es importante hacer notar que no se trata de una proteína única; sino de una familia muy diversa de inmunoglobulinas que se divide en dos tipos grandes tipos, kappa (κ) y lambda (λ). Como parte de los anticuerpos, las cadenas ligeras desempeñan la función de reconocimiento y defensa inmunológica, lo que condiciona su heterogeneidad estructural. Así, las cadenas ligeras constituyen el precursor de amiloide estructuralmente más diverso, propiedad que se refleja en la evolución de la enfermedad, que es, con mucho, la forma de amiloidosis clínicamente más heterogénea (64, 65).

Tabla 1. Fibras amiloides y sus precursores en humanos (Hazenberg, 2013)

Fibra amiloide	Proteína precursora	Sistémica o localizada	Adquirida o hereditaria	Órgano(s) blanco
AL	Cadenas ligeras de inmunoglobulinas	S, L	A	Todos los órganos, excepto SNC
AH	Cadenas pesadas de inmunoglobulinas	S, L	A	Todos los órganos, excepto SNC
Aβ2M	β 2 Microglobulina, silvestres	S	A	Sistema musculoesquelético
	β 2 Microglobulina, variante	S	H	Sistema nervioso autónomo
ATTR	Transtiretina, silvestre	S, L	A	Corazón
	Transtiretina, variantes	S	H	Corazón, ojos, SNP
AA	Proteína sérica amiloide A	S	A	Todos los órganos, excepto SNC
AApoAI	Apolipoproteína A1, variantes	S	H	Corazón, hígado, riñones, SNP, piel
AApoAII	Apolipoproteína A2, variantes	S	H	Riñones
ALys	Lisozima, variantes	S	H	Riñones
ALect2	Quimiotáctico derivado de células leucocitarias 2	S	A	Riñones, principalmente
AFib	Fibrinógeno α , variantes	S	H	Riñones, principalmente
ACys	Cistatina C, variantes	S	H	Sistema nervioso periférico, piel
Aβ	Péptido beta-amiloide, silvestre	L	A	SNC
	Péptido beta-amiloide, variantes	L	H	SNC
APrP	Proteína Prion, silvestre	L	A	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Insomnio familiar fatal
	Proteína Prion, variantes	L	H	
ACal	(Pro)Calcitonina	L	A	Cáncer tiroideo de células C
AIAPP	Amilina (Polipéptido amiloide de los islotes)	L	A	Islotes de Langerhans

APro	Prolactina	L	A	Prolactinomas
Alns	Insulina	L	A	Iatrogénico, inyección local
ASPC	Proteína surfactante pulmonar	L	A	Pulmón
AGal7	Galectina 7	L	A	Piel
ALac	Lactoferrina	L	A	Córnea
ASem1	Semenogelina-1	L	A	Vesículas seminales

Amiloidosis por cadena ligera (AL).

La amiloidosis AL es una de las discrasias de células plasmáticas (66), grupo de enfermedades caracterizadas por la expansión anormal de una clona de células plasmáticas que infiltra la médula ósea. En el caso de la amiloidosis AL, la clona infiltrante secreta cantidades excesivas de una cadena ligera libre, también conocida como proteína de Bence Jones (67), que se deposita en diferentes órganos y sistemas en forma de amiloide (68). La secreción en exceso de una cadena ligera monoclonal libre es una condición necesaria para que ocurra la deposición amiloide, sin embargo, no es suficiente, pues se sabe de pacientes que excretan grandes cantidades de una cadena ligera monoclonal a través de la orina, por varios años, sin mostrar signos de amiloidosis (69). Estos casos se conocen con gammapatía monoclonal de significado indeterminado, o MGUS, por sus siglas en inglés (70). La deposición amiloide de la cadena ligera parece ser consecuencia del concurso de varios factores, tanto intrínsecos (propios de la proteína) como extrínsecos (del microambiente tisular donde la cadena ligera se deposita), que actuando en conjunto resultan en la pérdida del plegamiento nativo de la proteína y su posterior deposición en forma de amiloide (35). Dos de los factores intrínsecos más estudiados son las mutaciones somáticas y la identidad del segmento génico de dominio variable (V_L) que da origen a la proteína. Las mutaciones somáticas juegan un papel central en la amiloidogénesis de las cadenas ligeras, debido a su potencial para desestabilizar el plegamiento nativo y favorecer la adopción de conformaciones no-nativas proclives a la agregación (71-74). Por otra parte, se ha visto que las cadenas ligeras que derivan de un

grupo menor de segmentos de genes de VL tienen mayor probabilidad de estar involucradas en agregación amiloide que otras (75-78). Esto ha llevado a proponer que, al menos en algunos casos, la secuencia codificada por estos segmentos de genes contiene información relevante para el mecanismo de deposición amiloide, y/o para procesos biológicos que favorecen este tipo de agregación por algún mecanismo actualmente desconocido (79-81). La contribución de ambos factores a la amiloidogénesis de las cadenas ligeras se expondrá con mayor detalle más adelante.

Epidemiología de la amiloidosis AL

La amiloidosis AL es la forma sistémica de amiloidosis diagnosticada con más frecuencia en los países desarrollados. En general, no hay muchos estudios acerca de la epidemiología de la enfermedad y los publicados hasta el presente dejan ver que tanto su incidencia como prevalencia varían dependiendo del país y el grupo poblacional estudiados. En México, la incidencia de amiloidosis AL es prácticamente desconocida. Hasta la fecha, hay un único estudio publicado en población mexicana, que se realizó de forma retrospectiva en individuos atendidos durante 30 años en una institución de salud privada (108). Con base en los datos disponibles, los autores del estudio sugieren que la amiloidosis AL es menos frecuente en la población mestiza mexicana que en los caucásicos(108). Otros estudios en población mexicana también han encontrado menor incidencia de otras discrasias de células plasmáticas en mestizos mexicanos, en particular MGSU, mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström(109). Sin embargo, no puede descartarse que la aparente menor frecuencia de discrasias de células plasmáticas en mestizos mexicanos se deba al subdiagnóstico de estas enfermedades en ciertas poblaciones por baja sospecha entre los médicos practicantes (108-110). En Inglaterra, la incidencia de AL amiloidosis se ha estimado en 3 casos por millón de habitantes por año (111), mientras que en la población del condado Olmsted, en el estado de Minnesota, investigadores de la Clínica Mayo estimaron la incidencia en 12 casos por millón de habitantes por año, sin

un incremento significativo de este parámetro en el período de 1990 a 2015 (112). Basados en este dato, ellos estimaron que en Estados Unidos se diagnostican 3859 nuevos casos de amiloidosis AL cada año (112). Quizás el estudio más extenso fue el realizado a nivel nacional en Estados Unidos usando las bases de datos de reclamos a las aseguradoras de pacientes con el diagnóstico de amiloidosis AL entre 2007 y 2015. Se estimó que la incidencia nacional varía en el intervalo de 9.7 a 14.0 casos por millón de habitantes por año (113). En concordancia con el estudio realizado por investigadores de la Clínica Mayo, no se observó incremento de la incidencia nacional de amiloidosis AL durante el período analizado, sin embargo, la prevalencia de la enfermedad sí aumentó de 15.5 casos por millón de habitantes por año en 2007 a 40.5 casos por millón de habitantes por año en 2015 (113). Este incremento puede deberse a una mayor sobrevida de los pacientes con amiloidosis AL a partir de la implementación de mejores estrategias terapéuticas y de diagnóstico temprano. Según este estudio, se estima que actualmente alrededor de 12,000 adultos viven con amiloidosis AL en Estados Unidos (113).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud incluyó a la amiloidosis AL como una condición sintomática definitoria para mieloma múltiple (llega a presentarse hasta en el 15% de los casos). La amiloidosis AL representa hasta el 65% de los casos de amiloidosis sistémica en el Reino Unido y el 93% en China, observándose una ligera mayor incidencia de esta condición en hombres que en mujeres, así como un incremento de su incidencia con la edad (63, 111-114).

Características clínicas de la amiloidosis AL.

La deposición amiloide de cadena ligera puede ocurrir secundaria a enfermedades linfoproliferativas que cursan con la sobreproducción de una cadena ligera monoclonal en estado libre, como el mieloma múltiple, la macroglobulinemia de Waldenström, la leucemia de células pilosas, y otras malignidades de células B. Sin embargo, la mayoría de los casos en que se

demuestra la presencia de amiloide AL, el desorden subyacente de las células plasmáticas no llegar a ser abiertamente maligno, por lo que la enfermedad se clasifica como Amiloidosis AL primaria (82).

No se debe descartar la ocurrencia de amiloidosis AL en cualquier paciente que refiera fatiga, edema, pérdida de peso sin explicación aparente, así como en casos de síndrome nefrótico no diabético, hepatomegalia o un aumento en los niveles de fosfatasa alcalina sin presencia de anormalidades hepáticas (83-85).

Los órganos más frecuentemente afectados en los pacientes con amiloidosis AL son riñones y corazón (alrededor del 70% de los casos), si bien hígado (22%), sistema nervioso periférico (15%) y tejidos blandos (15%) también son con frecuencia blanco de la deposición de AL (86). A diferencia de otras enfermedades hematológicas que tienen manifestaciones como anemia o sangrado, la amiloidosis AL usualmente progresa hacia el establecimiento de síndrome nefrótico, insuficiencia cardíaca y/o neuropatía periférica, lo que refleja en cada caso el impacto de la deposición amiloide en los órganos blanco (84). La presencia de macroglosia (87, 88) y púrpura periorbitaria (89, 90) son signos que están asociados con la enfermedad (si bien no patognomónicos (91)), pero aparecen en menos del 15% de los casos. Debido a la gran variedad de órganos que pueden ser afectados y a la pobre correlación entre la magnitud y distribución de la deposición y el grado de disfunción orgánica, existe una considerable heterogeneidad en la presentación clínica de esta patología, lo que dificulta su diagnóstico temprano y el establecimiento de terapias eficaces (84). Esto determina que la mayoría de los pacientes con amiloidosis AL sean diagnosticados cuando aparecen los síntomas y signos de disfunción orgánica, condición que reduce las opciones terapéuticas de las que pueden beneficiarse (84). La amiloidosis AL es una enfermedad grave, cuyo pronóstico suele ser, generalmente, no alentador. La supervivencia de los pacientes sin tratamiento suele ser de unos pocos meses, y se puede extender a 3-4 años aún bajo tratamiento en centros médicos especializados (84, 85, 92). Se ha demostrado que el diagnóstico temprano de la enfermedad mejora significativamente la expectativa de supervivencia de los pacientes, debido a que, cuanto más temprano es el diagnóstico, mayor es la probabilidad de que estos tenga conservada la función de sus órganos, lo que los convierte en candidatos

potencial a recibir terapias más eficaces para la amiloidosis AL, como es el trasplante de médula seguido de terapia ablativa (68, 94, 95). Esta terapia, si bien potencialmente curativa, sólo puede ser aplicada en pacientes que no presentan deterioro grave de la función de sus órganos vitales. Por lo anterior, se hace necesario el desarrollo de métodos que permitan el diagnóstico temprano de la amiloidosis AL.

Diagnóstico de la amiloidosis AL.

Como para la mayoría de las enfermedades, el paso inicial en el diagnóstico de amiloidosis AL es la identificación de síntomas y/o signos sugerentes de la enfermedad, lo cual requiere un minucioso interrogatorio y examen físico. En aquellos pacientes en que se sospecha amiloidosis AL, deben realizarse electroforesis con inmunofijación de suero y orina, con la intención de detectar la presencia en estos fluidos de una inmunoglobulina monoclonal (92). Si una inmunoglobulina monoclonal es detectada, entonces el paso siguiente es, como para cualquier otra amiloidosis, demostrar la presencia de depósitos amiloide en biopsia de tejidos. El estándar de oro para la confirmación histológica de los depósitos amiloide es la tinción con Rojo Congo, que generalmente se realiza en biopsias de tejido celular subcutáneo obtenido de la región periumbilical, o en biopsias de médula ósea o mucosa rectal (96-98). Este método toma ventaja de la propiedad compartida por todos los amiloides, cualquiera que sea su composición química, de unir rojo Congo y mostrar birrefringencia de color verde-manzana al ser analizadas en un microscopio de luz polarizada (83).

La alternativa menos invasiva para la detección de los depósitos de amiloide es la tinción de aspirado de grasa abdominal subcutánea, sin embargo, esta estrategia cuenta con baja sensibilidad (entre el 50 y el 80%, dependiendo el reporte), por lo que un resultado negativo no necesariamente excluye el diagnóstico, requiriéndose la toma de biopsia del órgano potencialmente afectado si, a pesar del resultado negativo inicial, la sospecha permanece alta (82, 99). Con mayor frecuencia, son los riñones el origen de la biopsia

analizada en estos pacientes, debido a que es, junto con el corazón, el órgano más frecuentemente afectado en la amiloidosis AL (96).

Una vez que se ha confirmado la presencia de depósitos amiloides, es indispensable realizar el diagnóstico diferencial, lo que implica identificar la proteína que está formando los agregados fibrilares. Este paso es clave, dado que permite determinar el tipo de amiloidosis que afecta al paciente y en consecuencia, definir el tratamiento más eficaz (que va desde quimioterapia hasta el trasplante del órgano afectado) y el manejo del paciente de acuerdo a la proteína precursora (83, 92, 100). Actualmente, el estándar de oro para la tipificación de los depósitos amiloide es la microdissección laser del material amiloide y la secuenciación parcial de la proteína fibrilar mediante análisis de espectrometría de masas (96). Si embargo, este método está disponible en muy contadas instituciones médicas a nivel mundial, debido al alto costo de los equipos que se requieren, así como por el alto nivel de entrenamiento de las personas encargadas de realizar el procedimiento. Por ello, la inmensa mayoría de las instituciones de salud realizan la tipificación de los depósitos amiloides mediante técnicas inmunológicas que usan anticuerpos específicos contra los diferentes precursores de amiloide. Tres métodos son los más frecuentemente usados: 1) inmunohistoquímica, 2) inmunofluorescencia y 3) microscopía electrónica de transmisión (MET) con marcado con oro coloidal. En el caso de la amiloidosis AL, la detección de los depósitos se realiza mediante anticuerpos policlonales contra determinantes antigénicos presentes en el dominio constante de las cadenas ligeras kappa y lambda, por lo que se les conoce como anticuerpos anti-kappa (κ) y anti-lambda (λ)(63). Se ha reportado que la detección inmunohistológica de los depósitos AL con esta clase de anticuerpos tiene una sensibilidad de entre 60% y 85% y una especificidad de alrededor de 90%, dependiendo del anticuerpo usado, el tipo de biopsia y el entorno médico específico (82, 96, 97, 101, 102). Esto significa que un número importante de casos de amiloidosis AL puede no ser identificado con exactitud y, en consecuencia, no recibir el tratamiento específico (96, 103-106). Varios factores pueden complicar la identificación inmunohistológica de los depósitos AL, como la presencia de una señal de fondo intensa derivada de la existencia normal de inmunoglobulinas en los tejidos, o que durante el proceso de formación de las

fibras o en la fijación de las muestras, se eliminen o se destruyan los epítomos que son reconocidos por los anticuerpos anti- κ y anti- λ (82). Es importante tener en cuenta que, si bien la cadena ligera monoclonal completa puede formar parte de los depósitos AL, lo más frecuente es que estos estén compuestos por fragmentos de la proteína que incluyen sólo el dominio variable, o éste más un fragmento de longitud variable del dominio constante (65, 107). No se ha establecido con certeza si la fragmentación de la cadena ligera amiloidogénica ocurre antes, o después de la formación de los depósitos. Los escasos datos disponibles sugieren que la fragmentación se debe a la acción de las proteasas de la matriz extracelular sobre los depósitos de amiloide formados por la cadena ligera intacta (107). La proteólisis de la cadena ligera fibrilar pudiera ser consecuencia del proceso inflamatorio, con infiltración linfocitaria, que acompaña a la deposición tisular.

La microscopía electrónica utilizando inmuno-marcaje con oro coloidal es más específica que la inmunohistoquímica (82, 85). Pruebas complementarias para determinar el grado de disfunción de los órganos incluyen el análisis de aspirado de médula ósea, electroforesis de suero y orina con inmunofijación, lo que permite la detección y clasificación de cadenas ligeras libres y/o una inmunoglobulina monoclonal, ecocardiograma, electrocardiograma y determinación de proteínas en orina de 24 horas (82, 85). En muchos casos de deposición sistémica, la amiloidosis es catalogada como de tipo AL a partir de descartar las de tipo AA o ATTR, dado que estas son las formas más frecuentes (82). Recientemente, se ha observado que la amiloidosis por transtiretina es más común de lo que previamente se había pensado y puede coexistir con gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS, por sus siglas en Inglés), lo que podría provocar diagnóstico incorrecto y en consecuencia, tratamiento inadecuado, con el potencial perjuicio del paciente (82, 104).

Anticuerpos.

Los anticuerpos son glicoproteínas secretadas por las células plasmáticas que desempeñan una función clave en la respuesta inmune

adaptativa. Estructuralmente, estos están formados por dos tipos diferentes de cadenas polipeptídicas, las cadenas pesadas (de alrededor de 50-55 kD y 450-550 residuos de aminoácidos, dependiendo de la clase) y ligeras (~25 kD y alrededor de 214 residuos de aminoácidos), las cuales se asocian en pares para dar la estructura básica del anticuerpo IgG. Las cadenas pesadas y ligeras se mantienen unidas mediante puentes disulfuro, así como mediante numerosas interacciones no covalentes que se establecen entre los aminoácidos que forman la interfase entre las cadenas. Los anticuerpos se clasifican en “clases”, de acuerdo con la secuencia de la cadena pesada, y en tipos, de acuerdo con la secuencia de la cadena ligera. En los mamíferos existen 5 “clases” diferentes de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En algunos casos las clases IgG e IgA se subdividen en subclases (isotipos), debido a polimorfismos en regiones conservadas de estas cadenas. Como antes se mencionó, las cadenas ligeras se subdividen en κ y λ (116).

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras son proteínas multidomínios, es decir, se pliegan formando dos o más dominios independientes con función específica(158). Las cadenas ligeras poseen dos dominios, el variable, o “VL”, y el constante, o “CL”, mientras que las cadenas pesadas poseen cuatro dominios, uno variable (VH) y tres constantes, denominados CH1, CH2 y CH3 (158-161). Como su nombre lo indica, los dominios variables se caracterizan por alta heterogeneidad de la secuencia de aminoácidos, la cual se concentra en tres regiones plegadas en forma de asa conocidas como “regiones o asas hipervariables”, o “regiones determinantes de la complementariedad” con el antígeno, o CDRs (del inglés Complementarity-determining Regions) (127). Además de en secuencia, los CDRs son muy heterogéneos en longitud. Los CDRs del dominio variable de cada par cadena ligera-cadena pesada del anticuerpo se disponen espacialmente cercanos en la proteína nativa, dando lugar al “sitio de unión con el antígeno”, o “paratope” (127, 160, 162). Los dominios CL y CH1 interactúa entre sí, para formar lo que se conoce como “interfase CL-CH1”. Los dominios CH2 y CH3 forman interfases con los dominios homólogos de la otra cadena pesada del anticuerpo y, en conjunto, forman el segmento Fc del anticuerpo, o fracción cristalizable, que se obtiene cuando el anticuerpo es digerido con papaína. Cada dominio de las cadenas

ligeras y pesadas del anticuerpo adopta el plegamiento característico de las inmunoglobulinas, conocida como “sándwich β ” (158, 159, 161).

Características estructurales de las cadenas ligeras de anticuerpos.

Como veremos con mayor detalle más adelante, los anticuerpos, o inmunoglobulinas, están formados por dos tipos de cadenas polipeptídicas, las pesadas y las ligeras. La estructura mas simple de un anticuerpo, la de la IgG, está formada por dos pares de cadenas, dos ligeras y dos pesadas. Las cadenas ligeras son proteínas de alrededor de 214 residuos de aminoácidos, los cuales se pliegan en dos dominios, el variable (VL) y el constante (CL) (Figura 4). Ambos dominios adoptan el plegamiento conocido como sándwich β de las inmunoglobulinas (35, 115). De acuerdo con la secuencia del CL, las cadenas ligeras se clasifican en dos grandes grupos, kappa (κ) y lambda (λ) (116). Inicialmente, y tomando como criterio la similitud de secuencia de los primeros 21-22 residuos del extremo N-terminal (región marco 1, o RF1, por sus siglas en Inglés), las cadenas ligeras fueron clasificadas en subgrupos de VL (116). Tanto la clasificación en κ/λ , como la clasificación en subgrupos, se basó en los patrones de reconocimiento de anticuerpos generados inmunizando con cadenas ligeras y absorbiendo los anticuerpos de reacción cruzada con otras cadenas ligeras para hacerlos específicos (117, 118). Posteriormente, la disponibilidad de miles de secuencias de inmunoglobulinas compiladas en los bancos de secuencia, así como de la estructura cristalográfica de decenas de anticuerpos, fragmentos Fab y cadenas ligeras libre, permitió establecer las bases estructurales de estas categorías (116, 119-122). La secuenciación de las regiones del genoma que albergan a los segmentos de genes que codifican las inmunoglobulinas permitió comprender las bases genéticas de la diversidad de los anticuerpos en general, y cadenas ligeras en particular (120-122). Ahora se sabe que los subgrupos de VL, que originalmente fueron establecidos con base en el patrón de reconocimiento de anticuerpos específicos para el FR1, representan grupos de cadenas ligeras codificadas por segmentos de genes filogenéticamente relacionados, que son

el resultado de eventos relativamente recientes de duplicación génica y divergencia ocurridos en la evolución de los vertebrados (120-122). Debido a los mecanismos de diversificación de los anticuerpos, las cadenas ligeras son estructuralmente muy heterogéneas, a tal grado que nunca han sido reportadas dos cadenas ligeras idénticas en el mismo paciente, o una misma cadena ligera en dos pacientes distintos.

Diversidad estructural de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas.

La función dual de los anticuerpos, como receptores de membrana en los linfocitos B y como efectores solubles de la respuesta inmune adaptativa, se basa en su capacidad de unión a una variedad casi infinita de moléculas propias y extrañas. Esto lo logran a través de la capacidad de presentar, en conjunto, una igualmente casi infinita variedad de sitios de unión al antígeno o paratopes (123). Tan alta diversidad estructural es consecuencia de los mecanismos moleculares que generan el repertorio policlonal de anticuerpos, los cuales operan tanto para las cadenas pesadas como para las ligeras (124). Los mecanismos que generan diversidad en el repertorio de anticuerpos son los siguientes: 1) unión combinatoria, mediante recombinación génica, del repertorio de segmentos de genes VL, JL y CL de las cadenas ligeras y VH, D, JH, y CL de las cadenas pesadas, 2) adición de nucleótidos N en el sitio de recombinación VH/D y D/JH, 3) combinación del repertorio de cadenas ligeras y pesadas, y 4) mutaciones somáticas en la región variable de cadenas ligeras y pesadas. Es importante hacer notar que, al margen de la diversidad de secuencia que caracteriza a estas proteínas -o probablemente gracias a esto- sólo una pequeña proporción de las cadenas ligeras llega a ser amiloidogénica.

Contribución de las mutaciones somáticas a la deposición amiloide de las cadenas ligeras.

Uno de los factores que modulan la propensión de las cadenas ligeras a formar amiloide son las mutaciones somáticas. Estos cambios puntuales ocurren durante la fase de maduración de la respuesta inmune, son dependientes del antígeno que causa la activación de la clona de linfocito B y tienden a localizarse en el VL de la cadena ligera, en particular en las regiones determinantes de la complementariedad con el antígeno, o CDRs, de acuerdo a su denominación en inglés “Complementarity Determining Regions” (125, 126). Debido a la tendencia a concentrar los cambios introducidos por las mutaciones somáticas, los CDRs fueron conocidas como regiones hipervariables (127). El fin funcional de las mutaciones somáticas es incrementar la afinidad de interacción del anticuerpo con el antígeno, lo cual potencia las funciones biológicas de los anticuerpos en el curso de la respuesta inmune, que depende de su capacidad de unión con el antígeno (128-131). Por otra parte, paralelo al efecto beneficioso, las mutaciones somáticas pueden tener un impacto estructural deletéreo, pues pueden comprometer la estabilidad termodinámica de la cadena ligera, favoreciendo su agregación (132-135). Numerosos estudios han encontrado una estrecha relación entre la propensión de las cadenas ligeras a depositarse en forma de amiloide in vivo, o de formar agregados de tipo amiloide in vitro, y la presencia de mutaciones somáticas en sitios estructuralmente claves del plegamiento (73, 74, 136). Es importante mencionar que el efecto desestabilizador de las mutaciones somáticas es favorecido por la secreción de la cadena ligera en estado libre, como es característico de la amiloidosis. Los contactos que la cadena ligera tiene con la cadena pesada en el contexto del anticuerpo completo, contribuyen a la estabilidad de esta, logrando compensar el efecto desestabilizador de las mutaciones (64). Se ha encontrado que el repertorio normal de anticuerpos policlonales contiene cadenas ligeras con mutaciones somáticas altamente desestabilizantes, cuyo impacto estructural se ha demostrado que es incompatible con el plegamiento nativo cuando se evalúa en la cadena ligera libre (64). Así, el efecto estabilizador de los contactos con la cadena pesada le

permitiría a la cadena ligera incorporar mutaciones altamente desestabilizantes, pero que, por otra parte, pueden ser ventajosas para la función de reconocimiento. Esto ampliaría el espacio de secuencia accesible para la cadena ligera, potenciando su función de reconocimiento, lo cual es consistente con la naturaleza adaptativa de la respuesta de anticuerpos. Al mismo tiempo, también resalta lo relevante que es la secreción en estado libre para el mecanismo de agregación amiloide de la cadena ligera.

La secreción en estado libre pone a la cadena ligera en una condición vulnerable al efecto deletéreo de las mutaciones somáticas, así como de factores ambientales, que bajo ciertas circunstancias causan su agregación (64). Si consideramos que el anticuerpo completo representa el contexto molecular en el que evolucionó la cadena ligera y en el que ejerce su función normal, la deposición amiloide de las cadenas ligeras pueden considerarse, al menos en parte, el resultado de su secreción fuera de su contexto natural (64).

Contribución de los isotipos κ y λ y los segmentos de genes VL a la agregación amiloide.

Las cadenas ligeras λ se asocian con mayor frecuencia a la deposición amiloide que las κ . La relación $\kappa:\lambda$ entre las cadenas ligeras amiloidogénicas es de 1:3 (137), inverso al que caracteriza al repertorio normal de anticuerpos, donde la relación es de 2:1 (138). Con base en este hallazgo, se ha propuesto que las cadenas ligeras λ poseen ciertas características estructurales que las hacen más propensas a formar amiloide. Estudios recientes, dirigidos a determinar la frecuencia de los segmentos de genes de VL en la amiloidosis AL, sugieren que la mayor frecuencia de las cadenas ligeras λ en la amiloidosis se explica, al menos parcialmente, por la fuerte asociación de un número reducido de segmentos de genes VL λ con la amiloidosis AL. Los segmentos VL λ cuya asociación con la amiloidosis AL es más clara son IGLV1-44 (1c), IGLV2-14 (2a2), IGLV1-33 (3r) y IGLV6-57 (6a) (75, 77, 78). En conjunto, estos segmentos de genes VL codifican el 67% (415) del total (616) de cadenas ligeras amiloidogénicas λ compiladas en la base de secuencia ALBase (<http://>

albase.bumc.bu.edu/aldb/) (35, 80, 137). Es importante destacar que esta base contiene, hasta el momento de redacción de este documento, la secuencia de 808 cadenas ligeras amiloidogénicas, 616 (76.2%) de tipo λ y 192 (23.7%) κ . Lo anterior sugiere que ciertos atributos estructurales, y/o la participación en procesos biológicos no identificados, hacen a las cadenas ligeras derivadas de los segmentos de genes VL λ antes mencionados altamente propensas a depositarse como amiloide in vivo (80). De los cuatro, el segmento VL que muestra la asociación más fuerte con la amiloidosis es IGLV6-57 (35, 76, 80). Este segmento de gen, único componente del subgrupo $\lambda 6$, codifica alrededor del 20% de las cadenas ligeras λ , lo que contrasta con su escasa frecuencia de expresión en el repertorio policlonal de linfocitos B de médula ósea de individuos normales que expresan una cadena ligera de tipo λ , que es del 2% (78, 139). La fuerte asociación de IGLV6-57 con la amiloidosis también se expresa en el hecho de que, con la única excepción de la proteína Jto, todas las cadenas ligeras $\lambda 6$ monoclonales identificadas hasta el presente han estado asociadas a alguna forma de deposición amiloide (140, 141). Se cree que la alta propensión de las cadenas ligeras $\lambda 6$ a la deposición amiloide está determinada en parte por elementos de secuencia codificados en la secuencia de línea germinal del segmento de gen IGLV6-57 (79). Investigaciones recientemente publicadas por el grupo dirigido por el Dr. Luis del Pozo Yauner soportan esta propuesta (142).

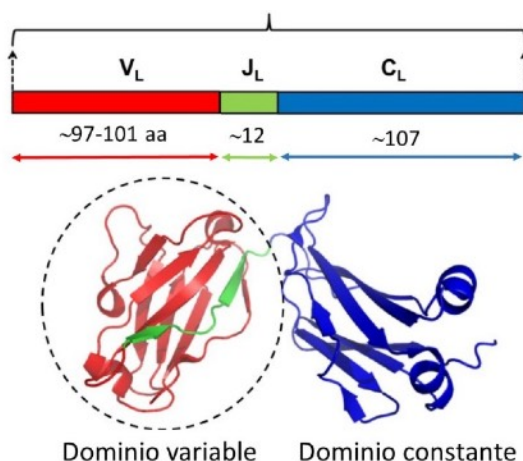


Figura 4. Estructura de las cadenas ligeras. Correlación de la contribución de los segmentos de genes V_L (rojo), J_L (verde) y C_L (azul) a la estructura del gen de la cadena ligera representado en la parte superior de la figura. El número aproximado de residuos y los dominios variable y constante.

Papel de otros factores en la agregación amiloide de las cadenas ligeras.

Sumado a las mutaciones somáticas y el segmento de VL, otros factores también pueden contribuir a la deposición amiloide de las cadenas ligeras in vivo, así como afectar el curso de la enfermedad. Uno de los factores más estudiados es la glicosilación en sitios específicos de la cadena ligera. Las glicosilaciones ocurren principalmente en la secuencia AsnXxxSer/Thr y se ha visto que son más frecuentes en las cadenas ligeras amiloidogénicas que en las no amiloidogénicas (143-146). Estas secuencias pueden estar codificadas en la línea germinal o resultar de los cambios introducidos por las mutaciones somáticas. Se cree que las glicosilaciones incrementan el potencial de agregación de las cadenas ligeras mediante la desestabilización del estado nativo, y/o al modificar las propiedades de superficie de la proteína (147, 148). La glicosilación también parece jugar un papel en la patogenia de otras formas de amiloidosis, por lo que sería importante establecer si la promoción de la agregación amiloide se debe a un mecanismo general, no influido por la secuencia de la proteína amiloidogénica o, al contrario, es secuencia dependiente.

Algunos estudios sugieren que la capacidad de ciertas cadenas ligeras de interactuar con componentes específicos de la matriz extracelular juega un papel importante en el mecanismo de deposición amiloide. La interacción selectiva con componentes de la matriz podría explicar, además, por qué las cadenas ligeras pertenecientes a ciertos subgrupos muestran tendencia a depositarse preferencialmente en ciertos órganos. Entre los componentes de la matriz extracelular cuyo efecto en la agregación amiloide de las cadenas ligeras ha sido más estudiado se encuentran los glucosaminoglicanos (GAG) (41, 149). Es bien conocido que las fibrillas amiloides de cadena ligera, así como de cualquiera de los otros precursores de amiloide, extraídas de los depósitos tisulares están asociadas invariablemente con GAG. La variante de GAG que predomina en los depósitos, en asociación con las fibrillas, es el sulfato de heparán. Se ha encontrado que algunos GAG pueden interactuar más fuertemente con las cadenas ligeras amiloidogénicas que con las no amiloidogénicas (150, 151). Los datos experimentales indican que los GAG

promueven la agregación selectiva de las cadenas ligeras amiloidogénicas, y en algunos casos, promueven la formación y estabilización de especies oligoméricas (150, 152) Además, se ha reportado que ciertos GAG pueden modular la cinética de la formación de fibrillas de las cadenas ligeras, un efecto que parece depender de la propensión natural de cada proteína AL a formar fibrillas(150).

Los cambios genéticos que ocurren comúnmente en el mieloma múltiple y MGUS, como las translocaciones en 14q y las deleciones en 13q, son también características de la amiloidosis AL. La translocación t (11;14) es más común en la amiloidosis AL (39-55%) que en el mieloma (15%) y se asocia con un pronóstico adverso de la enfermedad. De igual forma, la ganancia en 1q21 se asocia con la progresión de mieloma y AL (153, 154).

La proteína 6aJL2 como un modelo de estudio de agregación amiloide

A lo largo de las últimas cuatro décadas, varios estudios evidenciaron la fuerte asociación entre las cadenas ligeras $\lambda 6$ y la agregación amiloide (75-79, 139-141). La creciente evidencia aportada por estos estudios llevó a plantear la hipótesis de la posible contribución clave de la línea germinal del segmento de gen VL IGLV6-57 al comportamiento pro-amiloidogénico de las cadenas ligeras $\lambda 6$. Para probar esta hipótesis, Luis del Pozo Yauner y colaboradores diseñaron la proteína modelo 6aJL2, la cual es un dominio variable de cadena ligera recombinante con las secuencias de línea germinal de IGLV6-57 (también conocido como 6a) e IGLJ2 (segmento de unión, o joining) (79). Esta proteína consta de 111 aminoácidos y tiene un peso molecular de 11,952 Da (79). El segmento de gen IGLJ2 es el más frecuentemente expresado en células plasmáticas que producen un anticuerpo con una cadena ligera λ , incluidas aquellas secretoras de cadenas ligeras $\lambda 6$ (79).

La proteína 6aJL2 ha sido ampliamente caracterizada en cuanto a sus propiedades biofísicas y estructurales. Su estabilidad termodinámica ha sido determinada mediante desnaturalización reversible con agentes caotrópicos

(urea y cloruro de guanidina) y mediante calentamiento (79). Varios estudios han caracterizado la fibrillogénesis in vitro de 6aJL2, demostrando que esta forma agregados fibrilares con las propiedades del amiloide in vitro en condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura similares a las fisiológicas (79, 81, 155, 156). Tanto la cinética como el mecanismo de agregación fibrilar han sido estudiados mediante diferentes métodos biofísicos y espectroscópicos (79, 156). De acuerdo con un estudio realizado en el laboratorio del Dr. Daniel Alejandro Fernández (Facultad de Medicina, UNAM), la agregación fibrilar de 6aJL2 involucra la formación de un intermediario no nativo, resistente al calentamiento y a la presencia de urea, que parece no formar parte de la vía de plegamiento de la proteína (155). Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio sugieren que la hebra N-terminal (residuos 1-14) está involucrada en el mecanismo de agregación de la proteína. Se demostró que mutaciones puntuales en diferentes posiciones de esta hebra modulan la tendencia de la proteína a agregarse en forma de fibra. Por último, tanto la estructura cristalográfica como en solución han sido determinadas mediante difracción de rayos x (156) y resonancia magnética nuclear (157). Estos antecedentes hacen de la proteína 6aJL2 unos de los modelos más usados y mejor caracterizados para el estudio de la agregación amiloide de las cadenas ligeras.

Las proteínas como antígenos.

Las proteínas pueden actuar como antígenos, es decir, causar la producción de anticuerpos en un animal de laboratorio cuando son inoculadas en condiciones apropiadas. Debido a su complejidad estructural, las proteínas generalmente poseen numerosas regiones que pueden ser identificadas por el sistema inmune como blanco de anticuerpos. Estas regiones se denominan “determinantes antigénicos” o “epítomos”. Los antígenos, dependiendo de su naturaleza y estructura, pueden ser reconocidos por un número variable de linfocitos B, que proliferan y se diferencian a células plasmáticas, con el consiguiente aumento de su capacidad para producir y secretar anticuerpos que reconocen al antígeno que dio lugar a la respuesta inmune (163-165).

Dado que este tipo de respuesta involucra la producción de anticuerpos por numerosos clones de células plasmáticas, se le denomina “respuesta policlonal” de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales, por su naturaleza, son heterogéneos y reconocen una serie de epítomos del antígeno, por lo que el efecto del cambio de uno o un pequeño número de epítomos es menos significativo (166). Dado que reconocen a varios determinantes antigénicos de una misma proteína, los anticuerpos policlonales pueden ser más sensibles para detectar la presencia del antígeno, sobre todo si la preparación de la muestra que contiene el antígeno puede eliminar algunos de los determinantes antigénicos del mismo (166). Los anticuerpos policlonales pueden producirse de forma más rápida, barata y con técnicas más sencillas que las requeridas para obtener anticuerpos monoclonales (166-168). Pueden ser obtenidos en un lapso de dos a cuatro meses después de haber iniciado un esquema de inmunización (166-168). Por otra parte, los anticuerpos policlonales tienen como principal desventaja su composición heterogénea. Esto se debe a que la población de anticuerpos presentes en el plasma de un animal de laboratorio varía en el tiempo en función de la respuesta del sistema inmune a la entrada constante de moléculas con capacidad antigénica en el organismo (166-168). Los antígenos acceden al organismo ya sea por exposición natural a los componentes del entorno, o por inoculación artificial. La consecuencia es que es prácticamente imposible obtener dos preparaciones de anticuerpos policlonales idénticas, aún si la inmunización se realiza en el mismo animal. Esto obliga a recalibrar las técnicas analíticas en las que se usan anticuerpos policlonales cada vez que se cambia de preparación de anticuerpos. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales derivan de una sola clona de linfocitos B, por lo que son estructuralmente homogéneos y se unen al mismo epítomo (166). Los primeros anticuerpos monoclonales fueron generados en ratón mediante la técnica de hibridoma, descrita por Milstein y Köhler en 1975 (169). La generación de hibridomas comienza con la inmunización de un animal contra un antígeno específico y la posterior obtención de sus células esplénicas, entre las que hay numerosos clones de linfocitos B que fueron activados por la inoculación del antígeno. Los linfocitos B del bazo son fusionados con una línea celular de mieloma carente de la enzima hipoxantina

guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) que, por otra parte, ha perdido la capacidad producir anticuerpo. La fusión se lleva a cabo en presencia de sustancias químicas como polietilenglicol, que facilitan la fusión de la membrana citoplasmática de células que entran en contacto físico. Las células híbridas, resultado de eventos de fusión celular, son cultivadas en medio selectivo, adicionado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), que obliga a las células a utilizar una vía alterna de síntesis de purinas a través de HGPRT. Únicamente las células híbridas, con las características de inmortalidad de las células de mieloma y la enzima HGPRT procedente de los linfocitos B, son capaces de sobrevivir en el medio selectivo (169, 170).

Las principales ventajas de los anticuerpos monoclonales, con respecto a los policlonales, son su homogeneidad y alta especificidad, por lo que son útiles para evaluar cambios de conformación molecular, interacciones proteína-proteína, estados de fosforilación y la identificación de miembros individuales de una familia de proteínas. Sin embargo, varios estudios han demostrado que los anticuerpos policlonales también pueden funcionar con sensores de la conformación de la proteína antígeno (171-173). Otra ventaja de los anticuerpos monoclonales es que pueden ser producidos indefinidamente mediante el cultivo del hibridoma productor (166). Sin embargo, la mono-especificidad que caracteriza a los anticuerpos monoclonales puede limitar su utilidad, dado que pequeños cambios en la estructura del epítipo, como polimorfismos, glicosilaciones y desnaturalización, pueden afectar su afinidad de unión(166).

Anticuerpos anti-péptidos.

Como ha sido mencionado, cuando se usa una proteína como inmunógeno, la respuesta de anticuerpos del animal inmunizado se dirige contra todas las regiones de la molécula que son suficientemente inmunogénicas como para causar una respuesta humoral eficaz. El resultado es una mezcla de anticuerpos policlonales que reconocen diferentes determinantes antigénicos. Si bien para ciertas aplicaciones esto puede ser

beneficioso, en otra es totalmente desventajoso, sobre todo si lo que se desea es dirigir la respuesta inmune hacia una región particular de la proteína. En estos casos, una de las estrategias usadas frecuentemente es inmunizar los animales con un péptido sintético con la secuencia de la región de la proteína hacia la cual se desea dirigir la respuesta del animal. Este tipo de anticuerpos se conocen como anticuerpos antipéptidos (174) y han sido usados por mucho tiempo para diferentes aplicaciones. Los anticuerpos antipéptidos han demostrado su utilidad en la caracterización estructural de proteínas, como es la asignación de estructura secundaria(175), determinación de la organización topológica de la cadena polipeptídica(176, 177), identificación de regiones localizadas en la superficie molecular, expuestas al solvente(178-182), la identificación de regiones de interface entre proteínas que forman complejos(181, 183, 184), identificación de sitio de unión hormona-receptor(185), identificación de epítomos neutralizantes en virus(186, 187), y el estudio de los cambios conformacionales asociados a la función de ciertas proteínas (172, 188, 189). Por otra parte, la producción de anticuerpos antipéptidos se enfrenta a limitaciones determinadas por la inherente menor antigenicidad de los péptidos, si se comparan con la proteína completa (173, 181). Para contender con esta desventaja, además del uso de adyuvantes de diferente composición (190), se han desarrollado varias estrategias, siendo una de las más frecuentes la conjugación, mediante unión covalente, del péptido contra el cual se desea generar la respuesta inmune a una proteína altamente inmunogénica, como la albúmina sérica bovina o la hemocianina de la lapa americana, comúnmente conocida como KLH por su nombre en inglés *Keyhole limpet hemocyanin* (191). KLH es una proteína de muy alto peso molecular y altamente inmunogénica que se ha usado como portadora de moléculas poco inmunogénicas, como péptidos sintéticos de unos pocos aminoácidos (191, 192), y cadenas de ADN (193) o no inmunogénicas si se inyectan de forma aislada, como gangliósidos (194) y haptenos (195). Otra estrategia desarrollada para aumentar la respuesta de anticuerpos contra péptidos poco inmunogénicos es la de sintetizar moléculas de naturaleza peptídica con estructuras ramificadas repetitivas, conocidas como “péptidos multi-antigénicos” o también como “péptidos multi-epitóticos”. En la literatura

científica son conocidos como MAP, por su nombre en Inglés “*multiple antigen peptide*” (173). Los MAP se generan a partir de un núcleo inmunológicamente inerte formado por varias lisinas, el cual posee ocho o más sitios en los que el péptido contra el que se desea generar los anticuerpos es generado por síntesis química. De ese modo, el MAP posee varias copias del mismo péptido, denominándose MAP homomérico, o de dos péptidos diferentes, denominándose MAP heteromérico. En cualquier caso, la estructura repetitiva y el alto peso molecular de la molécula incrementa su inmunogenicidad (173, 196). La tecnología de los MAP ha sido usada para inmunización antitumoral (197, 198), vacunas antivirales (199-203), la inducción de respuesta de anticuerpos protectores contra bacterias patógenas (204) y parásitos unicelulares, como los del género plasmodium (205, 206) y la producción de anticuerpos para uso diagnóstico (207, 208) y como herramientas para la investigación (209). Es importante hacer notar que los MAP, si bien tienen múltiples aplicaciones, también tienen algunas limitaciones, como la de no siempre generar anticuerpos que muestren la capacidad de reconocer no sólo el péptido individual, también la proteína de la cual este se origina, que en muchos casos es el objetivo deseado (210).

Uso de anticuerpos en el estudio de las amiloidosis.

Se ha reportado la generación tanto de anticuerpos policlonales como monoclonales capaces de reconocer específicamente fibras amiloides u oligómeros pre-fibrilares. Algunos de estos anticuerpos presentan la característica de reconocer epítomos genéricos asociados a un estado de agregación específico, independientemente de la secuencia de aminoácidos. El hecho de que estos epítomos estén ampliamente distribuidos, sean distinguibles y no se superpongan entre fibras y oligómeros, sugiere que existe una diferencia estructural en la organización de los polipéptidos entre ambos estados de agregación, condición que puede ser compartida por distintos tipos de amiloides (211-215).

La mayoría de los anticuerpos generados contra fibras amiloides tienden a dirigirse hacia porciones no estructuradas de los péptidos, que no están formando parte del núcleo de las fibras. En caracterizaciones de anticuerpos generados a partir de ratones inmunizados con fibras del péptido β ($A\beta$) se encontró que la mayor parte de la respuesta estuvo dirigida hacia la porción amino terminal de 12 residuos del péptido (211-215). Se encontró que los anticuerpos generados en la respuesta son capaces de reconocer formas monoméricas. Dicho reconocimiento da información de las partes del péptido que no están involucradas en la estructura de las fibras, pero dice muy poco acerca de la naturaleza de las fibras mismas (212, 216).

La identificación de epítomos conformacionales en las fibras amiloides añade una nueva dimensión para el entendimiento de su estructura (212, 216). Los anticuerpos conformacionales, es decir, aquellos que reconocen regiones del antígeno que dependen del ordenamiento 3D de la molécula, tienen el potencial de proveer información más detallada y sensible acerca de los fenómenos asociados al plegamiento incorrecto de las proteínas(217).

Existe evidencia que indica que las fibras maduras y los intermediarios oligoméricos solubles comparten elementos de su estructura. Parte de esta evidencia proviene de hallazgos realizados haciendo uso de anticuerpos que reconocen epítomos genéricos a todos los tipos de amiloides y oligómeros solubles (213, 214, 217-219).

B. O'Nuallain y R. Wetzel han reportado la generación de anticuerpos monoclonales dependientes de conformación de tipo IgM (WO1 y WO2) obtenidos mediante la inmunización con fibra de $A\beta_{40}$ que son específicos para los depósitos amiloides y que no reconocen la forma nativa de la proteína precursora amiloide u oligómeros solubles (219). Estos anticuerpos también son capaces de reconocer formas fibrilares de tipos de amiloides distintos, incluidos transtiretina, poliglutamina y $\beta 2$ microglobulina. Esto sugiere que estos anticuerpos reconocen elementos estructurales compartidos por varios amiloides, como pudieran ser las estructuras del núcleo fibrilar formado por hebras β (219).

Además del valor de los anticuerpos anti-fibra como sondas estructurales, el estudio de la naturaleza de la respuesta inmune hacia el amiloide es de especial importancia, debido al interés que existe en nuevos enfoques de tratamiento, como la vacunación activa y pasiva para disminuir y/o revertir el crecimiento de los depósitos amiloides, como se ha podido demostrar en modelos animales de deposición de cadenas ligeras y Alzheimer (219-221).

Desarrollo de un sistema diagnóstico.

Validación de biomarcadores.

Antes de incluir un biomarcador particular en un panel adoptado para diagnóstico de rutina, se debe demostrar la validación clínica del mismo. Se debe demostrar la correlación del marcador con procesos fisiopatológicos específicos y criterios de valoración clínica, así como la reproducibilidad y precisión del método analítico. Alguno de estos requisitos pueden ser barreras para la validación clínica de un ensayo. Por ejemplo, cientos de biomarcadores han sido identificados (o propuestos) para enfermedades complejas como el cáncer, sin embargo, solo un número relativamente pequeño de estos biomarcadores llega a ser clínicamente significativo, y la mayoría tiene un significado clínico desconocido o está caracterizado de forma incompleta. Otros, aunque teóricamente adecuados, puede que no tengan una expresión consistente o suficiente para justificar su inclusión en un ensayo.

La validación técnica de un biomarcador en el contexto de un ensayo es un proceso complejo que depende del método analítico, y que incluye la sensibilidad del ensayo, especificidad, confiabilidad y reproducibilidad, así como la naturaleza de la muestra biológica y su integridad. La especificidad corresponde a la capacidad del método de distinguir al biomarcador de interés de otros componentes estructuralmente similares que se encuentren dentro de la misma muestra. La confiabilidad y reproducibilidad determinan la precisión general del método analítico. La naturaleza de la muestra debe tomarse en cuenta con respecto a la localización y distribución de la expresión del

marcador; la muestra más apropiada debe ser lo menos invasiva posible (orina, esputo, saliva, suero, plasma o sangre total) y contener concentraciones suficientes del analito. Por lo tanto, la viabilidad para obtener la muestra influye en la validación de un marcador. Si el método analítico presenta suficiente sensibilidad, la elección de la muestra está determinada por la facilidad de recolección y análisis de la misma. Por el contrario, si la sensibilidad constituye un factor limitante y la medición del marcador es problemática en un determinado fluido biológico, entonces el tipo de muestra se selecciona de acuerdo con la concentración del marcador independientemente de si representa un desafío mayor para la recolección y preparación de la muestra (244).

Así pues, el desafío principal que se presenta al validar un biomarcador es la caracterización de un marcador que esté presente en cantidades suficientes en una muestra que sea estable y mínimamente invasiva como para ser detectable por los distintos tipos de inmunoensayos y, lo más importante: que se correlacione de forma fiable con un criterio de valoración clínico.

Disponibilidad, estabilidad, especificidad y reactividad cruzada de los anticuerpos como reactivos.

Podría decirse que el mayor impedimento para la integración de un inmunoensayo es la disponibilidad de anticuerpos de alta calidad (es decir, estables y específicos) (245). Esto representa una variedad de desafíos de fabricación, desde la generación y caracterización de ligandos, la variabilidad en el proceso de fabricación del ensayo y la reactividad cruzada.

Los ensayos tipo sándwich se realizan adicionando una mezcla de anticuerpos de detección a una muestra biológica, con la premisa de que cada anticuerpo se unirá a su analito diana. La agitación térmica o mecánica asegura que cada componente reactivo encuentre su objetivo. Esto también da como resultado una interacción de cada anticuerpo de detección con todos los demás analitos, anticuerpos de captura y otros anticuerpos de detección, lo que aumenta las oportunidades de reactividad cruzada (245). La reactividad cruzada puede

comprometer el rendimiento de un ensayo. La calidad y reproducibilidad de los inmunoensayos depende de la disponibilidad de ligandos de captura altamente específicos para unirse estrechamente a los analitos diana. Sin embargo, predecir interacciones de alta afinidad entre proteínas es complejo debido a la hidrofobicidad y heterogeneidad en el tamaño de los aminoácidos constituyentes. Actualmente, los anticuerpos monoclonales generados por técnicas clásicas de hibridoma constituyen los ligandos de captura más utilizados (246). La producción y caracterización a gran escala de los parámetros de afinidad, especificidad, reactividad cruzada y cinética (a saber, tasas de asociación y disociación) son procesos laboriosos y costosos que dificultan la validación de un reactivo; además, los anticuerpos validados para un ensayo pueden presentar reactividad cruzada cuando se adoptan a distintos formatos de ensayos, lo que indica la necesidad de validar los anticuerpos para una aplicación específica (247).

La química de los anticuerpos también debe considerarse en el contexto de la inmovilización con el fin de mantener la precisión y reproducibilidad de un inmunoensayo. Los anticuerpos son relativamente estables en comparación con otras proteínas, aunque incluso una desnaturalización mínima puede exponer regiones hidrófobas que predisponen la unión no específica y alteran potencialmente el límite de detección inferior (247).

Antecedentes.

Los anticuerpos disponibles comercialmente para la detección de depósitos amiloides están dirigidos a epítopes localizados en el dominio CL. Se ha demostrado que hasta en el 40% de los casos, estos anticuerpos no reconocen adecuadamente los agregados amiloides de cadena ligera, lo que impide realizar el diagnóstico correcto del paciente y establecer el tratamiento debido (96, 102). No se ha establecido con certeza la causa de este fallo de reconocimiento, pero se cree que se debe a la falta del dominio CL en los depósitos, debido a su destrucción por las proteasas de la matriz extracelular, o por la destrucción de los epítopes que estos anticuerpos reconocen durante la

preparación del tejido para realizar la técnica histológica. En ocasiones, no es posible establecer el diagnóstico debido a que los anticuerpos anti-CL pueden tener reacción cruzada con las cadenas ligeras de los anticuerpos policlonales presentes en el tejido, lo cual genera una reacción de fondo que impide el diagnóstico inequívoco de amiloidosis AL. Una alternativa a los anticuerpos anti-CL es la de generar anticuerpos que reconozcan epítopes del dominio VL, el cual determina la capacidad amiloidogénica de las cadenas ligeras y en consecuencia siempre está presente en los depósitos. Idealmente, los anticuerpos anti-AL debe ser específico para determinantes antigénicos cuya distribución se restringe a los agregados amiloides de cadena ligera, no reaccionando con la proteína soluble. Es importante hacer notar que los anticuerpos anti-VL representan un reto metodológico, debido a la alta variabilidad de secuencia de este dominio. Sin embargo, el Dr. Alan Solomon y colaboradores demostraron que es posible producir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales que reconozcan determinantes antigénicos del VL, los cuales puede diferenciar cadenas ligeras pertenecientes a diferentes subgrupos VL (118, 222, 223). Además, el grupo del Dr. Alan Solomon demostró que algunos anticuerpos anti-VL pueden reconocer determinantes antigénicos compartidos por cadenas ligeras pertenecientes a diferentes subgrupos VL. Los trabajos del grupo del Dr. Solomon dejan claro que los anticuerpos anti-VL tienen aplicación tanto para el diagnóstico como la terapia de la amiloidosis AL (221, 224, 225).

Uno de los objetivos del laboratorio de Estructura de Proteína del Dr. Luis del Pozo Yauner (INMEGEN) es el desarrollo de agentes con aplicación tanto en el diagnóstico como en la terapia de la amiloidosis AL. Este tipo de agente se conoce como teranósticos y representan un área muy activa de la investigación, con mucho potencial de aplicación en enfermedades neurodegenerativas y por plegamiento incorrecto de las proteínas (226-229), el cáncer (230-236), las enfermedades del corazón (237), los desórdenes autoinmunes (238, 239), las enfermedades endocrino-metabólicas (240, 241), enfermedades parasitarias (242), entre otras. Los trabajos del laboratorio se han basado en la proteína modelo 6aJL2, la cual, como se mencionó antes, es un dominio variable (VL) recombinante con la secuencia de la línea germinal de

los segmentos de gen IGLV6-57 e IGLJ2(79). El segmento de gen IGLV6-57 es el único miembro del subgrupo de VL λ 6 y está muy fuertemente asociado a la agregación amiloide. Esto se refleja en la alta proporción de cadenas ligeras amiloidogénicas reportadas en la base de secuencias AL-Base que derivan de este segmento de gen (<http://albase.bumc.bu.edu/aldb>). Basado en las evidencias que ligan a este segmento de gen con la amiloidosis, se postuló que al menos parte de los determinantes estructurales que hacen a las cadenas ligeras λ 6 altamente propensas a formar amiloide in vivo están contenidas en la secuencia de la línea germinal del segmento IGLV6-57. Aplicando una estrategia basada en algoritmos computacionales de predicción, diseño y caracterización de librería de péptidos sintéticos, proteólisis parcial con varias proteasas, difracción de rayos X así como varias técnicas espectroscópicas, el laboratorio del Dr. Luis del Pozo Yauner identificó varios fragmentos de la proteína 6aJL2 que forman agregados fibrilares con las propiedades del amiloide in vitro(142). En total, se identificaron tres fragmentos fibrilogénicos de 6aJL2. Un fragmento, que resultó el más fibrilogénico de todos, se extiende desde Ser26 a Arg39 e incluye el CDR1 y parte de la hebra β C. Un segundo fragmento se extiende de Phe62 a Lys79 y en la proteína nativa incluye las hebras β D y E, El tercer fragmento fibrilogénico es el estructuralmente más complejo, pues está formado por dos subfragmentos unidos por el enlace disulfuro entre Cys23 y Cys88, unión covalente intradominio invariante en el dominio VL(142). Estos resultados llevaron a sugerir que la agregación amiloide de la proteína 6aJL2, así como de las cadenas ligeras λ 6 es promovida por varias regiones profibrilogénicas que están distribuidas a todo lo largo del dominio. De acuerdo con esta propuesta, las regiones promotoras de la agregación de 6aJL2 estarían involucradas en la formación del núcleo estructural compacto de la fibra amiloide, rico en estructura β , mientras que aquellas que no forman amiloide in vitro, como se demostró en el estudio previo(142), se localizarían hacia la periferia de la estructura fibrilar, adoptando una conformación más flexible y potencialmente más expuesta al solvente. También se propuso que, como un requerimiento estructural obligado en el mecanismo de agregación, la implicación de todas o la mayoría de las regiones profibrilogénicas de 6aJL2 en la estructura del

núcleo fibrilar implicaría el amplio reordenamiento estructural de la proteína. Un estudio muy reciente del laboratorio del Dr. Luis del Pozo Yauner, en colaboración con laboratorios de Francia y Suiza, aplicó resonancia magnética nuclear en estado sólido y demostró que la agregación amiloide de 6aJL2 implica una amplia reconversión conformacional de la molécula, que afecta a todas sus partes (243). Los hallazgos de estos estudios son consistentes con la idea de que varias regiones de la proteína 6aJL2 van a tener una conformación diferente en el estado fibrilar respecto al nativo. Algunas de estas regiones van a formar parte del núcleo β de la fibra, mientras otras van a quedar decorando el exterior de este. Debido al amplio reordenamiento que sufre la proteína para alcanzar la conformación fibrilar, puede esperarse que la conformación de la mayor parte de las regiones de 6aJL2 esté determinada por contactos locales, de corta distancia, que es cercano a los que ocurre en los péptidos. Puede deducirse que un péptido sintético con la secuencia de una región de 6aJL2 que sufre un amplio reordenamiento conformacional en el contexto de la proteína fibrilar debe adoptar una conformación en solución más cercana a la conformación fibrilar que a la que adopta la región en la proteína nativa.

II. JUSTIFICACIÓN

Los métodos utilizados actualmente para el diagnóstico de las amiloidosis presentan varios inconvenientes. El diagnóstico específico de la amiloidosis AL se realiza mediante la tipificación inmunohistoquímica de los depósitos tisulares con anticuerpos que reconocen el dominio constante (CL) de la cadena ligera; sin embargo, hasta el 30% de los casos no pueden ser correctamente identificados debido a que frecuentemente el CL no está presente en los depósitos. A esto hay que añadir la menor especificidad de los anticuerpos contra las cadenas ligeras amiloidogénicas tipo lambda (248). Las técnicas más modernas incluyen tinciones con anticuerpos que detectan oligómeros pre-fibrilares, que no se unen a proteínas plegadas de forma nativa o monómeros; sin embargo, dada la posibilidad de que otras proteínas agregadas estén presentes en los tejidos, la especificidad es limitada (249). Otros métodos, como la microscopía de fuerza atómica, requieren de equipos especializados. La mayoría de las instituciones de salud públicas en México no cuentan con los equipos y/o reactivos necesarios para realizar este tipo de ensayos. El uso de ensayos de ELISA podría proporcionar una herramienta para la detección rápida de agregados. Es por esto que se propone el desarrollo de un sistema para la identificación de depósitos amiloides de cadenas ligeras basado en anticuerpos monoclonales murinos que reconozcan epítopes del dominio variable mediante ELISA. Esto ayudará a un diagnóstico más preciso de la enfermedad y por lo tanto a una mejora en el manejo de los pacientes.

Basados en estos antecedentes y razonamientos, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

III. HIPOTESIS

Los anticuerpos generados a partir de la inmunización con fragmentos peptídicos del dominio variable de la cadena ligera reconocerán el estado fibrilar de la proteína. Este tipo de anticuerpo permitirá identificar depósitos de agregados fibrilares amiloides en muestras de tejido obtenidos de un modelo de deposición amiloide en ratones. Los anticuerpos serán capaces, mediante ELISA, de distinguir entre cadenas ligeras derivadas de distintas líneas germinales permitiendo llevar a cabo tipificación de depósitos tisulares amiloides en muestras de pacientes.

IV. OBJETIVOS

Desarrollar un sistema de inmuno-tipificación de depósitos tisulares amiloides de cadenas ligeras basados en anticuerpos monoclonales o policlonales que reconozcan epítopes localizados en el dominio variable de la proteína 6aJL2.

Objetivos Específicos

1. Generar anticuerpos policlonales y monoclonales mediante la inmunización de animales de laboratorio (conejos y ratones, respectivamente) con péptidos sintéticos con la secuencia de regiones específicas de la proteína 6aJL2 que participan en el mecanismo de agregación amiloide.
2. Establecer la capacidad de los anticuerpos monoclonales o policlonales anti-péptidos para reconocer el estado fibrilar de la proteína 6aJL2 en inmunoensayos in vitro.
3. Determinar la capacidad de los anticuerpos monoclonales o policlonales anti-péptidos de reconocer depósitos de agregados amiloides de la proteína 6aJL2 en muestras de tejido obtenidas de un modelo murino de deposición amiloide (modelo de amiloidoma).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de las secuencias para la producción de los anticuerpos policlonales.

Uno de los objetivos fundamentales de este proyecto es la generación de anticuerpos, ya sean de origen policlonal o monoclonal, con propiedades de reconocimiento novedosas, diferentes de las de los anticuerpos usualmente usados en las técnicas de inmunotipificación de depósitos de amiloide de cadenas ligeras, los cuales reconocen epítomos nativos de los dominios constantes de tipo κ y λ . Los datos del análisis de los agregados fibrilares de la proteína 6aJL2 mediante diferentes técnicas espectroscópicas sugieren con fuerza que la agregación amiloide de esta proteína se acompaña del reordenamiento conformacional amplio de la molécula. Los resultados del análisis mediante resonancia magnética nuclear en estado sólido de los agregados fibrilares de la mutante puntual 6aJL2-R25G, realizado recientemente en colaboración con grupos europeos, son consistente con una conformación de la proteína en el estado fibrilar ampliamente diferente de la nativa. Con base en estos antecedentes, se tenían, al menos, dos alternativas. Una primera era usar los agregados fibrilares de la proteína 6aJL2 como inmunógeno en el proceso de generación de los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales. La segunda alternativa era usar péptidos sintéticos con la secuencia de regiones específicas de la proteína 6aJL2 para inmunizar los animales de laboratorio. Se decidió aplicar la segunda estrategia, debido a las ventajas que se discutirán en extenso en la sección indicada de esta tesis. Se eligieron cinco regiones diferentes de la proteína, las cuales se destacan por su papel estructural clave en la formación de los agregados amiloides. Estas regiones son:

- 1) Región Ans1 a Ser12, que comprende la hebra- β A (N-terminal). La secuencia de la región elegida es $_1\text{NFMLTQPHSVS}_{12}$.

- 2) Región desde Ser14 a Cys23, la cual comprende la hebra- β B. La secuencia de la región elegida es ${}_{14}\text{SPGKTVTISC}_{23}$.
- 3) Región desde Arg25 a Tys36, que comprende el asa de reconocimiento CDR1. La secuencia de la región elegida es ${}_{25}\text{RSSGSIASNYVQWY}_{36}$.
- 4) Región Ser42 a Ser56, la cual contiene las hebras β C' y C''. La secuencia de la región elegida es la siguiente: ${}_{42}\text{SSPTTVIYEDNQRPS}_{56}$.
- 5) Región desde Asp60 a Ala71, incluye la hebra- β E y el asa que le continúa, ambos localizados en la región FR3. La secuencia de la región elegida es la siguiente: ${}_{60}\text{DRFSGSIDSSNSA}_{71}$.

La localización de las regiones enlistadas en la estructura 3D de la proteína 6aJL2 se muestra en la figura 4.

Producción de policlonales.

Los anticuerpos policlonales contra péptidos sintéticos con secuencia de regiones específica de la proteína 6aJL2 fueron producidos en conejos New Zealand por la compañía GenScript Co. Para la inmunización de los animales, los péptidos sintéticos fueron conjugados con hemocianina de la lapa americana (KLH). Esto se hace con el objetivo de incrementar la inmunogenicidad de los péptidos, que por si solos son poco inmunogénicos. De acuerdo con la información recibida de la compañía, en la primera inoculación se usó adyuvante completo y en las cuatro restantes inoculaciones el adyuvante usado fue el incompleto de Freund. No se obtuvo más información de la compañía acerca del método de inmunización y de evaluación de la respuesta inmune. Los anticuerpos policlonales anti-péptido sintético fueron purificados mediante cromatografía de afinidad. La pureza de la preparación final de anticuerpos fue $\geq 94\%$. De acuerdo con la información recibida de la compañía, una vez purificados, los anticuerpos fueron diluidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4), a la que se le adicionó azida de sodio al 0,02% como agente antimicrobiano. La concentración de anticuerpos

en las preparaciones finales fue determinada mediante espectrofotometría UV (280 nm).

Producción de anticuerpos monoclonales.

1. Inmunización.

Se preparó un lote de tres ratones Balb/c hembras de seis semanas para ser inmunizados. Se preparó una emulsión de antígeno y adyuvante, tomando 74.5 μ l de fibra amiloide de 6aJL2 (671 μ g/ml), equivalente a 50 μ g de fibra, se adicionando 25.5 μ l de TiterMax® Gold (TiterMax® Gold Adjuvant, Sigma-Aldrich) para completar 100 μ l para cada ratón. La mezcla se agitó hasta obtener una emulsión estable color blanco. Previamente a la inmunización, los animales fueron sedados y sangrados por el plexo retro-orbital con ayuda de una pipeta Pasteur, obteniendo aproximadamente 500 μ L de sangre. La sangre se dejó 1 hora a 37 °C para obtener un coágulo, posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 10 min. a 5000 rpm, y se separó el suero del coágulo. Las muestras se guardaron a -20°C. Los ratones fueron inoculados inyectando 100 μ l de la preparación de antígeno por vía intraperitoneal. Los ratones fueron inmunizados cada semana durante 6 semanas. Se tomaron muestras de sangre por vía retro-orbital cada dos semanas para evaluar la respuesta inmune de los animales. Una vez que los ratones alcanzaron títulos adecuados de anticuerpos IgM e IgG, se seleccionó el animal con los títulos más elevados y se le realizó un último estímulo inyectando el doble de antígeno una semana antes de llevar a cabo la fusión celular.

2. Fusión de células de bazo y células de mieloma

Preparación de células esplénicas.

El ratón inmunizado fue sangrado por vía retro-orbital para obtener el suero y determinar los títulos de anticuerpos por ELISA. El ratón fue sacrificado por dislocación cervical. En campana de flujo laminar se realizó lo siguiente: Se

extrajo el bazo en condiciones asépticas. Se colocó el bazo en una caja de Petri estéril, que contenía 5 ml de medio DMEM (GE Healthcare HyClone™ Dulbecco's Low Glucose Modified Eagles Medium) sin suero fetal bovino (SFB) y un cuadro de tela de organza estéril. El bazo se envolvió con la tela de organza y con ayuda del émbolo de una jeringa estéril se presionó el bazo suavemente para disgregar el tejido, el material fue resuspendido con ayuda de una pipeta Pasteur. Se colocó la suspensión celular en un tubo Corning de 50 ml y se lavó una vez con medio DMEM sin SFB, mediante centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos a 37°C., y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el botón celular en 50 ml de medio DMEM y se centrifugó nuevamente.

Preparación de las células de mieloma.

Las células de mieloma usadas para la fusión celular fueron mantenidas en crecimiento exponencial en medio DMEM con SFB. Para esto, se sembraron 24 horas antes, colocando aproximadamente 5×10^6 células de mieloma en botellas de 75 cm² con 20 ml de medio DMEM enriquecido con 10% de SFB y se incubaron a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. El día de la fusión las células fueron resuspendidas mediante agitación suave; posteriormente con ayuda de una pipeta de 5 ml la suspensión se colocó en un tubo Corning de 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en medio DMEM sin suero fetal bovino.

Fusión Celular.

Se mezclaron las células de bazo y las de mieloma en una relación aproximada de 5:1 (5 células espléndidas por 1 célula de mieloma) en un tubo Corning de 50 ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se disgregaron suavemente. Se agregaron 500 µl de polietilenglicol (PEG al 42%) poco a poco, en un tiempo aproximado de 60 segundos agitando suavemente. Posteriormente se agregaron 5 ml de medio DMEM sin suero fetal bovino, por goteo y agitando suavemente en un lapso de 3 min; de la misma forma se adicionaron 15 ml más en un lapso de 1 minuto y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 37°C. Se eliminó el sobrenadante y

se resuspendieron las células en medio DMEM con 10% de SFB adicionado con HAT. Se colocaron 200 µl por pozo en placas de 96 pozos y se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂. Las células fueron revisadas diariamente para localizar pozos con híbridos viables (que se presentan como cúmulos de células), descartar contaminación y realizar recambios del medio de cultivo. Diez días después de la fusión celular se realizó el cambio a medio de cultivo adicionado con HT por 5 días, al transcurrir estos las células se cultivaron con medio DMEM con 10% de SFB.

3. ELISA para la detección de anticuerpos.

Para la identificación de híbridos productores de anticuerpos se tomó el sobrenadante de los cultivos para la realización de ELISA de captura de anticuerpos, que se llevó a cabo de la siguiente manera: el antígeno se diluyó en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 para obtener una concentración de 10 µg/ml, y se sensibilizaron placas Corning® Costar de 96 pozos con un volumen de 100 µl por pozo de la solución de antígeno. Las placas se incubaron 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso sobre una gasa. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con 200 µl/pozo de solución salina de fosfatos y Tween 20 0.05% (PBS-Tween 20). Posteriormente se agregaron 200 µl/pozo de solución de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS-Tween) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se realizaron tres lavados. Se tomaron 100 µl de sobrenadante de cada pozo de los cultivos y se colocaron directamente en los pozos de la placa de ELISA. Se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron los lavados y se colocaron 100 µl del conjugado anti-IgG de ratón H+L acoplado a peroxidasa a una dilución 1:2000 en PBS-Tween. Se incubó por 2 horas a 37°C y después se realizaron 3 lavados. En cada pozo se colocaron 100 µl de la solución cromógeno/sustrato de OPD+H₂O₂, y se dejó incubando durante 30 minutos. Se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 2N para

peroxidasa. Se leyeron las absorbancias en un lector de placas de ELISA ThermoScientific Multiskan GO.

4. Clonación.

Una clona es una población o colonia de células derivadas de una sola célula progenitora. La especificidad de los anticuerpos producidos por los híbridos celulares se incrementa mediante la clonación. El procedimiento se realizó como sigue: Se colocaron 100 μ l de medio de cultivo DMEM-10% SFB en toda la fila A de una placa de cultivo de 96 pozos. Se tomaron 100 μ l de suspensión celular de aquellos híbridos positivos a la fibra amiloide de 6aJL2 y se colocaron en la posición A1 y a partir de esta se hicieron diluciones dobles seriadas hasta el final de la fila, se dejaron reposar las células durante 10 minutos. Se contaron las células de cada pozo en un microscopio invertido y aquel pozo que contenía de 30 a 40 células se diluyó en 18 ml de medio DMEM con SFB al 10%. De esta suspensión celular se sembraron 200 μ l por pozo en las 7 filas restantes de la placa. La placa se mantuvo a 37°C con 95% de aire y 5% de CO₂ durante una semana. Posteriormente se revisó la presencia de clonas celulares y aquellos pozos donde sólo se encontraron un cúmulo de células fueron seleccionados para probarlos en ELISA y determinar si las clonas estaban secretando anticuerpos específicos; las clonas positivas fueron elegidas para una nueva clonación y su subsiguiente expansión en cultivo.

Selección de secuencias de proteínas amiloidogénicas.

Para evaluar la especificidad del reconocimiento de los anticuerpos generados en este proyecto, se requirió disponer de un panel de dominios variables recombinantes de cadenas ligeras, pertenecientes al subgrupo λ 6, así como a otros subgrupos κ y λ . Para ello, se seleccionaron aleatoriamente un grupo de 11 cadenas ligeras amiloidogénicas, cuya secuencia está depositada en la base de secuencias ALBase (<http://albase.bumc.bu.edu/aldb>). AL-Base,

conocida también como “Amyloid Light Chain Database” es una base de datos curada y una colección de herramientas analíticas y gráficas diseñadas para facilitar el análisis de las cadenas ligeras amiloidogénicas identificadas en pacientes con amiloidosis AL. AL-Base fue creada por investigadores del Centro de Amiloidosis del “Boston University Medical Center” y contiene 4364 secuencias anónimas de nucleótidos y aminoácidos de cadenas ligeras, de las cuales 808 codifican proteínas monoclonales que se demostró clínicamente que forman depósitos amiloides en pacientes con AL. El grupo de secuencias seleccionadas incluye 5 de cadenas ligeras λ 6, dos cadenas ligeras λ 1, una cadena ligera λ 2, dos cadenas ligeras κ 1 y una cadena ligera κ 4. Las secuencias fueron enviadas a la compañía GenScript para la síntesis de los segmentos de ADN con la secuencia de estas proteínas. Una vez sintetizados los genes, estos fueron clonados en el vector de expresión en bacteria pET27b+. La secuencia del inserto clonado en cada caso fue verificada en la compañía mediante los procedimientos convencionales. La secuencia obtenida en cada caso fue recibida como parte de la información que la compañía provee al cliente. Se verificó cuidadosamente que cada construcción tuviera un inserto con la secuencia esperada. La compañía proporcionó las construcciones como material liofilizado. Estas construcciones fueron usadas para expresar las cadenas ligeras del panel en bacteria *E. coli* de la cepa BL21(DE3), como se describe a continuación.

Transformación de construcciones de rVL amiloidogénicos en células de *E. coli* BL21(DE3).

Las preparaciones liofilizadas de las construcciones de los dominios variables recombinantes clonados en pET-27b fueron resolubilizadas en agua calidad miliQ, usando el procedimiento sugerido por el proveedor (GenScript). Se determinó la concentración de cada solución mediante espectrometría a 260 nm y se hizo el cálculo para la preparación de las soluciones de trabajo (6ng/ μ l) de cada una. Se tomó un volumen suficiente de células competentes *E. coli* BL21 (DE3) almacenada a -80 °C en glicerol 15% y se descongelaron

en hielo por aproximadamente 30 min. Después se tomaron 5 μ l de la dilución de trabajo 6 ng/ μ l de cada construcción y se depositaron en tubos plásticos de 1.5 ml, para tener una cantidad total de ADN plasmídico por tubo de ~30 ng. Posteriormente se depositaron 50 μ l de células competentes en cada tubo y se mezcló cuidadosamente. Se incubaron las mezclas células/ADN en hielo durante 30 minutos, luego se incubaron los tubos a 42 °C por 45 segundos en un Thermoblock e inmediatamente los tubos fueron regresados al hielo y mantenidos en él por dos minutos. Se añadieron 500 μ l de medio SOC (sin antibiótico) a las bacterias y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos con agitación constante. Finalmente se depositaron 100 μ l de cada cultivo en placas de LB-agar suplementado con kanamicina 30 μ g/ml y se incubaron a 37 °C toda la noche. Es importante hacer notar que el vector pET27b porta un gen que confiere resistencia a la kanamicina a la bacteria transformante, por lo que el cultivo en placas de LB-agar/kanamicina de las bacterias sometidas a la transformación por shock térmico permite seleccionar las bacterias transformantes. Al día siguiente, se seleccionó una colonia por placa, de la cual se transfirieron bacterias a 10 ml de medio líquido LB/kanamicina 30 μ g/ml contenido en tubos Corning de 50 ml. Los tubos se inocularon de forma independiente con células tomadas de cada una de las colonias correspondientes a cada transformación. Se dejaron incubando toda la noche a 37°C con agitación constante. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones de bacterias en glicerol 15%, como se describe a continuación.

Preparación de glicerol para almacenar las células transformadas con las construcciones de los rVL.

Se tomaron alícuotas de 1.5 ml de cada cultivo bacteriano y se depositaron en cuatro tubos de 1.5 ml de capacidad con tapa de rosca, previamente rotulados. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 ml del mismo cultivo y se

les adicionaron 450 μ l de solución de glicerol al 50% estéril. La concentración final de glicerol fue de 15.5 %. Los tubos fueron almacenados a -80 °C.

Expresión y purificación de los rV_L de cadenas ligeras amiloidogénicas.

Se cultivaron células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las construcciones de interés en matraces de 2 L conteniendo medio YT2X suplementado con kanamicina 30 μ g/ml. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante de ~120 rpm. El crecimiento de los cultivos se evaluó mediante la medición de la absorbancia a 600nm (A_{600}). Cuando los cultivos alcanzaron la densidad celular adecuada (A_{600} de 1.2 a 1.3), los matraces se trasladaron a otro agitador que se encontraba a una temperatura de 22 °C y se continuó la incubación por aproximadamente 15 minutos. Enseguida, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición de IPTG a una concentración final en el cultivo de 1mM. Se continuó la incubación con agitación constante de 120 rpm por una noche a 22°C y con agitación constante. Luego de incubar toda la noche los cultivos fueron transferidos a hielo, hasta su procesamiento.

La extracción de las proteínas recombinantes se realizó por gradiente de sacarosa, el cual es descrito brevemente a continuación: Después de cada ensayo de expresión se determinó la A_{600} nm de los cultivos, para estimar el incremento de biomasa durante la etapa de inducción. Posteriormente el volumen de cada cultivo se distribuyó en botellas para centrifugación de 250 ml. Los cultivos se centrifugaron a 8500 rpm por 1 hora a 4 °C para sedimentar las bacterias. Se desecharon los sobrenadantes y las células de cada botella se resuspendieron en 25 ml de solución de sacarosa al 20% en Tris-HCl 25 mM pH 8.0. Luego de aproximadamente 30 minutos de incubación en la solución de sacarosa, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 8500 rpm por 45 minutos a 4 °C. Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes para su análisis. El paquete de células de cada botella fue resuspendido en 25 ml de agua miliQ enfriada a 4 °C. Luego de estar aproximadamente 30 min resuspendidas, las bacterias fueron sedimentadas mediante centrifugación y los sobrenadantes

transferidos a frascos limpios, debidamente rotulados. Las concentraciones totales de proteínas de los extractos periplásmicos acuosos fueron determinadas mediante la medición de la A_{280} en un espectrofotómetro (modelo y marca).

La evaluación de los niveles de expresión de las recombinantes obtenidas fue realizada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Experimento de fibrilogénesis *in vitro*.

Para la generación de fibra, se preparó 1 ml de una dilución 1 mg/ml de cada de las proteínas recombinantes obtenidas en PBS y se depositaron en celdas plásticas para fluorescencia de 4 ml de capacidad. En cada celda se colocó una micro-barra magnética cubierta de Teflón de 7x22 mm. Las cubetas se transfirieron a un agitador multipunto e incubadas a 37 °C con agitación constante de 200 rpm.

Modelo murino de amiloidoma.

Se inocularon 70 mg de agregados fibrilares de proteína 6aJL2-R25G suspendida en 500 μ l de PBS por vía subcutánea en la zona interescapular de un ratón Balb/c hembra. Los agregados fueron generados previamente mediante incubación de la proteína a 37°C con agitación constante. Se observó la evolución del animal durante 23 días y al día 24 se extrajo el amiloidoma. El material obtenido fue enviado al laboratorio de histología del INMEGEN para su inclusión en un bloque de parafina. Se cortaron secciones del bloque para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Dot-Blot.

Se cortaron membranas de nitrocelulosa de 5x7 cm y se marcaron con los espacios necesarios para ubicar las muestras de proteínas. Se colocaron 2 μ l de cada una de las proteínas utilizadas a una concentración constante de 10 μ g/ml, y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon las membranas con leche descremada al 5% en PBS-Tween durante una hora con agitación constante. Transcurrido el tiempo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario (anticuerpos policlonales a evaluar) correspondiente (previamente diluido en solución de bloqueo), por tres horas a 4 °C en agitación constante. En seguida las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente en agitación constante. Entre cada paso, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS durante 5 minutos. Finalmente, las membranas fueron reveladas y observadas en un fotodocumentador UVITEC Mini HD6.

VI. RESULTADOS

Expresión y purificación de los rVL de cadenas ligeras amiloidogénicas.

Se expresaron 9 cadenas ligeras amiloidogénicas con un peso molecular de alrededor de 12 kDa (Figura 5): la proteína modelo 6aJL2, cinco proteínas derivadas de la línea germinal $\lambda 6$, una derivada de $\lambda 2$, una de $\kappa 1$ y una de $\kappa 4$. La concentración obtenida de cada una de las proteínas fue de alrededor de 50 mg de proteína por litro de cultivo, estas cantidades fueron suficientes para la generación de las fibras necesarias utilizadas en los ensayos de dot-blot para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos policlonales.

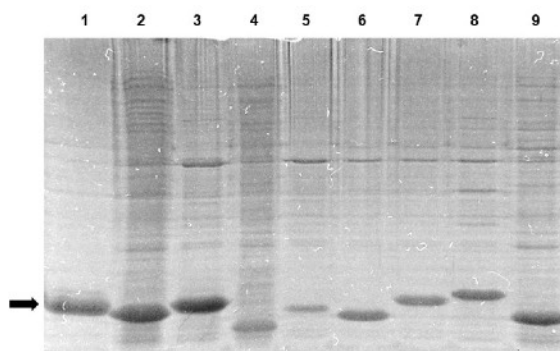


Figura 5. Gel con las purificaciones de los rVL amiloidogénicos. 1) proteína modelo 6aJL2, 2) REC_B3 ($\kappa 4$), 3) EF589444_2a2 ($\lambda 2$), 4) BRE_018_08 ($\kappa 1$), 5) AF124183_6a ($\lambda 6$), 6) AF462661_6a ($\lambda 6$), 7) EF589553_6a ($\lambda 6$), 8) EF589559_6a ($\lambda 6$) y 9) EU599342_6a ($\lambda 6$).

Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos policlonales a cadenas ligeras amiloidogénicas $\lambda 6$.

Se utilizaron 5 anticuerpos policlonales, generados contra segmentos de la proteína 6aJL2 (Figura 6) utilizando péptidos sintéticos. Para la selección de las secuencias de los péptidos se consideraron las regiones pro-fibrilogénicas y

los motivos protectores de la agregación, segmentos importantes en la cinética de agregación de la proteína modelo. La evaluación del reconocimiento de los anticuerpos policlonales se realizó mediante ensayos de *dot-blot*, utilizando preparaciones de las formas solubles y fibrilares de los rV_L previamente expresados.

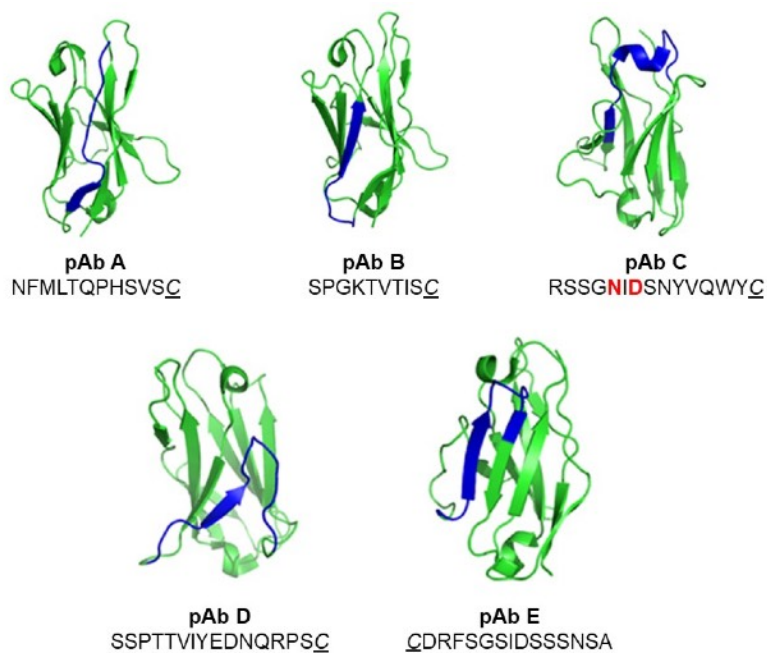


Figura 6. Segmentos seleccionados de la proteína 6aJL2. Cinco anticuerpos policlonales fueron generados en conejo contra cinco segmentos de la proteína 6aJL2 (en azul) utilizando péptidos sintéticos, cuyas secuencias aparecen en la imagen.

En la primera evaluación, con rV_L derivados de la línea germinal λ6 el reconocimiento observado fue el siguiente: Los anticuerpos A y D no reconocieron ninguna de las formas solubles. El anticuerpo B reconoció los rV_L EF589559 y EU599342; el anticuerpo C únicamente mostró reconocimiento por EU599342; por último, el anticuerpo E reconoció todos los rV_L (Figura 7, panel a). Al emplear las preparaciones fibrilares, los anticuerpos mostraron el siguiente patrón: El anticuerpo A reconoció únicamente a la proteína modelo (6aJL2-G25) y AF462661. El policlonal B reconoció todas las fibras, con variaciones en la intensidad. El anticuerpo C demostró un intenso reconocimiento por la proteína EU599342, y uno más escaso hacia la proteína modelo y su variante 6aJL2-G25. El policlonal D reconoció todos los rV_L,

excepto EF589559. Finalmente, con el anticuerpo policlonal E se observó un reconocimiento uniforme de todas las fibras (Figura 7, panel b).

Con base en los resultados anteriores, se pudo observar que los anticuerpos detectaron, en esencia, las formas fibrilares de las cadenas ligeras, con excepción del anticuerpo E, que reconoció ambos estados.

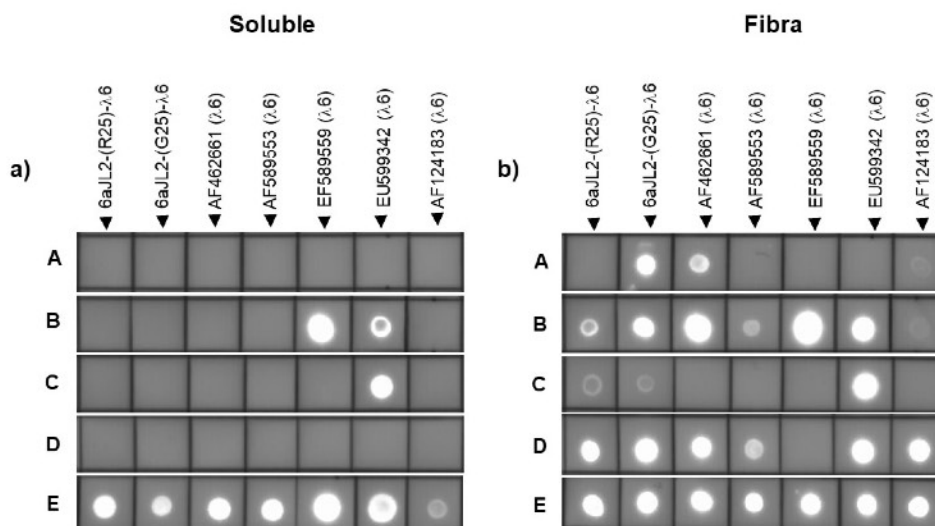


Figura 7. Evaluación de los anticuerpos policlonales de conejo mediante dot-blot. Los anticuerpos fueron evaluados contra las formas solubles y fibrilares de la proteína modelo 6aJL2 y otras cadenas ligeras amiloidogénicas derivadas de la línea germinal λ6.

Con la finalidad de probar si los pAbs reconocían únicamente proteínas derivadas de la línea germinal λ6 u otras líneas germinales, se confrontaron contra cadenas ligeras derivadas de λ2, κ1 y κ4. Al evaluar con las formas solubles, se observó que los anticuerpos no reconocieron ninguna de las proteínas; con excepción nuevamente del anticuerpo E, que reconoció la forma soluble de 6aJL2, como previamente se había observado (Figura 8, panel a).

Utilizando las formas fibrilares, se observó que el pAb B reconocía los rVL de REC_B3 y BRE_018_08, derivados de la línea germinal kappa. El resto de los anticuerpos repetía el patrón de reconocimiento de 6aJL2 previamente observado y no mostraron reconocimiento hacia los rVL derivados de las otras líneas germinales (Figura 8, panel b).

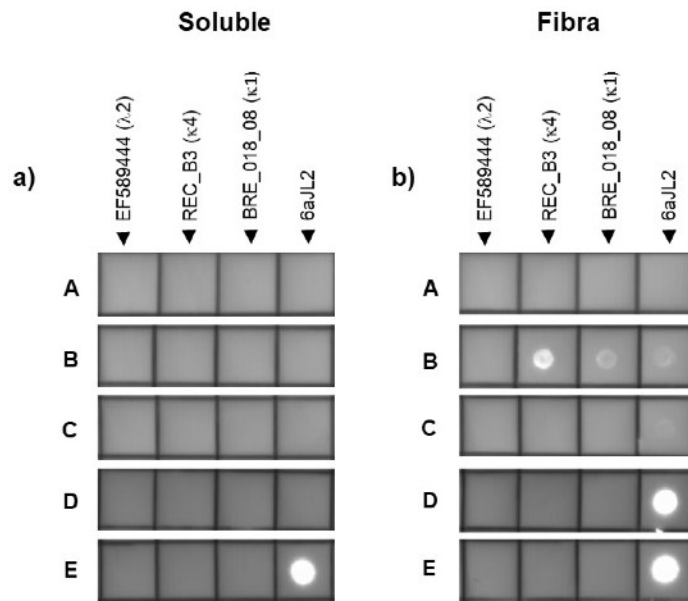


Figura 8. Evaluación del reconocimiento de los policlonales de conejo de cadenas ligeras derivadas de líneas germinales diferentes de lambda 6. Para evaluar el reconocimiento específico de los policlonales se utilizaron tres cadenas ligeras amiloidogénicas derivadas de otras líneas germinales diferentes de $\lambda 6$. Los policlonales D y E demostraron reconocer específicamente la proteína 6aJL2.

Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos policlonales en cortes de un amiloidoma generado en un modelo murino.

Se evaluó el reconocimiento de los policlonales en cortes del amiloidoma generado en ratón con la intención de probarlos en un material semejante al que podría provenir de muestras de pacientes. La evaluación se realizó mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (Figura 9). El reconocimiento fue el siguiente: El reconocimiento del anticuerpo policlonal A fue aparentemente más evidente y extendido. El reconocimiento de los anticuerpos B, C, D y E en cambio, se apreció más localizado.

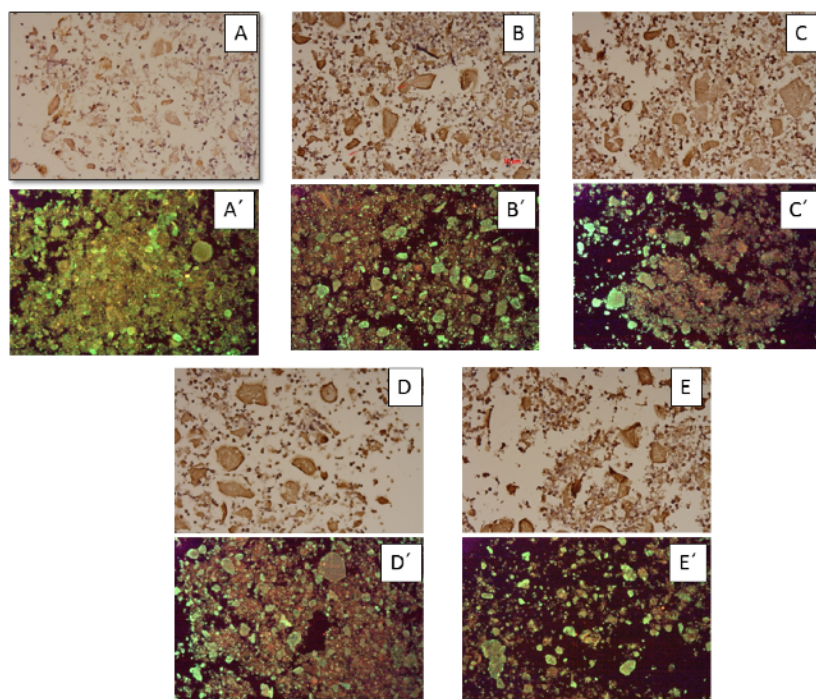


Figura 9. Reconocimiento de los anticuerpos policlonales en cortes del amiloidoma murino. Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos policlonales. El reconocimiento del anticuerpo policlonal A fue el más evidente, en contraste con los anticuerpos B, C, D y E, cuyo patrón de reconocimiento fue más delimitado.

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales.

Se generaron anticuerpos monoclonales a partir de la inmunización de ratones con agregados fibrilares *in vitro* de 6aJL2. En evaluaciones preliminares, utilizando sobrenadante de medio de cultivo, se identificaron cuatro clonas productoras de anticuerpos capaces de reconocer a la proteína modelo: 3E4C12H8, 3E4G7D9, 3E3C1D5 y 3E3G1D10. Las clonas productoras fueron expandidas en cultivo para producir y posteriormente purificar los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos purificados fueron evaluados mediante ensayos de dot-blot. Ninguno de los anticuerpos monoclonales purificados obtenidos mostró reconocimiento en estas evaluaciones.

VII. DISCUSIÓN

Las amiloidosis son clasificadas de acuerdo al tipo de proteína presente en los depósitos fibrilares. Entre las varias formas de amiloidosis, la amiloidosis por cadenas ligeras de inmunoglobulinas (amiloidosis AL) es la más representativa de las amiloidosis sistémicas. En la amiloidosis AL ocurre la deposición de cadenas ligeras kappa o lambda. Los depósitos AL son difíciles de detectar mediante inmunohistoquímica debido a que las regiones variables de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas, por su naturaleza, son muy diversas, y la longitud de las regiones constantes que llegan a formar parte de los depósitos amiloides AL es variable. Buxbaum ha sugerido que entre el 10 y el 15% de los pacientes con AL tenían una pequeña porción o ninguna de secuencias de regiones constantes en sus depósitos amiloides. Se ha reportado que anticuerpos comerciales disponibles, diseñados preferentemente hacia las regiones constantes de las cadenas ligeras, no reaccionan bien ante los depósitos amiloides AL en secciones de tejidos, aunque sí reaccionen en extractos amiloides en inmuno-blot (38).

La confirmación de las amiloidosis se realiza a partir de la identificación de depósitos amiloides en secciones de tejidos. La determinación del tipo específico de amiloide es de vital importancia para elegir el tratamiento adecuado y proporcionar un pronóstico preciso. Si bien recientemente se han reportado metodologías de micro-purificación de amiloide y métodos para el análisis de secciones incluidas en parafina, estas son complicadas de llevar a cabo en un laboratorio de rutina. El examen inmunohistoquímico de secciones de tejidos sigue siendo considerada la mejor opción para la tipificación de las amiloidosis, además de que es posible llevarlo a cabo en la mayoría de los laboratorios de patología (38).

En una etapa del trabajo, se caracterizó el reconocimiento de un conjunto de anticuerpos diseñados contra regiones específicas de la proteína 6aJL2. Estas regiones corresponden a secuencias que juegan un papel relevante en la cinética de agregación de la proteína, ya sea como motivos que promueven la agregación o como secciones consideradas protectoras ante la agregación.

Se generaron fibras amiloides *in vitro* a partir de cadenas ligeras amiloidogénicas recombinantes, cuyas secuencias fueron obtenidas de la base ALBase, base de datos que compila las secuencias de cadenas ligeras amiloidogénicas halladas en pacientes con amiloidosis AL atendidos en el Centro de Amiloidosis (The Amiloidosis Center) del Centro Médico de la Universidad de Boston.

Los anticuerpos policlonales evaluados mediante ensayos de dot-blot demostraron tener distintos niveles de reconocimiento de la proteína 6aJL2 y de otras cadenas ligeras amiloidogénicas en sus formas nativas y fibrilares. El reconocimiento del anticuerpo policlonal A demostró ser irregular. Esto puede ser explicado por dos factores. El primero, debido a variaciones en la exposición del sitio de reconocimiento, es decir, que al estar ubicado al inicio de la proteína, los aminoácidos queden más o menos expuestos; o bien, que adquieran una conformación desordenada al momento de la formación de las fibras o al ubicarla en la membrana de nitrocelulosa, por lo que, a pesar de estar presente, ese segmento sea escasamente reconocido por el anticuerpo policlonal.

El anticuerpo policlonal B tampoco demostró un reconocimiento efectivo de la línea germinal $\lambda 6$. Si bien logró diferenciar entre proteína soluble y fibra, al confrontarlo en el grupo de las cadenas ligeras amiloidogénicas lambda 6, esta capacidad fue bastante variable. Además, mostró un reconocimiento relativamente mayor por cadenas derivadas de líneas germinales distintas ($\kappa 4$). Destacó el reconocimiento de la cadena EF589559 ($\lambda 6$), identificada fuertemente tanto en forma fibrilar como en forma soluble.

El anticuerpo policlonal C no demostró reconocimiento de ninguna de las dos conformaciones de las distintas proteínas.

El policlonal D, generado contra la secuencia SSPTTVIYEDNQRPS_C, y que corresponde al segmento ₄₂SSPTTVIYEDNQRPS₅₆ dentro de la proteína modelo, fue el único capaz de distinguir entre las formas fibrilares y solubles de las proteínas amiloidogénicas de cadenas ligeras lambda 6 y distinguir la línea germinal de entre otras líneas germinales. Esto sugiere que el sitio reconocido por el policlonal D es un sitio de reconocimiento aparentemente exclusivo de

esta línea germinal y que no está presente en líneas germinales distintas. De igual forma, se puede inferir que este segmento no forma parte dentro del núcleo de las fibras y por lo tanto está expuesto en la superficie de las fibras.

El anticuerpo policlonal E, diseñado contra la secuencia CDRFSGSIDSSNSA, y que corresponde al segmento ${}_{60}\text{DRFSGSIDSSNSA}_{72}$, no distinguió entre las formas fibrilares y solubles de las proteínas amiloidogénicas derivadas de la línea germinal lambda 6. Sin embargo, sí mostró un reconocimiento específico por esta línea germinal $\lambda 6$ al confrontarlo con líneas germinales distintas. Esto puede sugerir que ese segmento está expuesto tanto en la forma soluble como en la forma fibrilar y es propio de la línea germinal. Al comparar la secuencia de las cadenas amiloidogénicas se puede observar que la región limitada entre los aminoácidos 60 y 72 dentro de la proteína modelo no son sitios hipervariables y que, por el contrario, es una región bastante conservada durante el proceso de recombinación somática de la línea germinal.

La capacidad del anticuerpo policlonal D de distinguir entre la forma soluble y fibrilar de las proteínas, así como de reconocer buena parte de las proteínas derivadas de la línea germinal $\lambda 6$ permite suponer que es posible desarrollar anticuerpos capaces de reconocer agregados amiloides derivados de líneas germinales específicas. Esto podría ser útil para el desarrollo de anticuerpos como reactivos para el diagnóstico diferencial de amiloidosis por cadenas ligeras como reactivos para el diagnóstico diferencial de amiloidosis por cadenas ligeras.

Siguiendo la estrategia experimental planteada, se trabajó en la obtención de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer a la proteína 6aJL2, empleando como antígeno fibra amiloide *in vitro*. De esta etapa, se identificaron cuatro anticuerpos monoclonales que al ser evaluados mediante dot-blot no mostraron ningún tipo de reconocimiento.

VIII. PERSPECTIVAS

De los anticuerpos policlonales caracterizados se identificó uno (anticuerpo policlonal D) capaz de distinguir entre la forma soluble y fibrilar de las proteínas evaluadas, así como de reconocer proteínas derivadas de la línea germinal lambda 6, lo que ya representa una ventaja, si se compara con los anticuerpos comercialmente disponibles para la tipificación de amiloidosis AL, que en la mayoría de los casos han sido diseñados contra el dominio constante de las cadenas ligeras o tienen poca especificidad contra las cadenas ligeras tipo lambda (248).

Quedará por evaluar si la especificidad de los anticuerpos policlonales podría ser de utilidad para el diagnóstico diferencial de amiloidosis AL. Ya que el estándar de oro para la tipificación de las amiloidosis es la inmunohistoquímica, durante del proyecto se buscó tener acceso a muestras de biopsias renales de pacientes. Aunque las amiloidosis en general son consideradas enfermedades raras, también es cierto que se encuentren subdiagnosticadas.

Se tendrán que realizar más trabajos para determinar si los anticuerpos caracterizados podrían ser empleados en un sistema de ELISA ya que durante el desarrollo de este proyecto se presentaron distintas limitaciones, como la falta de anticuerpos en cantidades suficientes para llevar a cabo la validación del ensayo, así como la dificultad para conseguir muestras de pacientes, y finalmente la falta de tiempo.

Al haber sido diseñados contra segmentos de la proteína modelo 6aJL2, no se sabe aún si alguno de estos segmentos se pueda encontrar en suero o orina a modo de biomarcador. Se tendría que evaluar, además, si reconocen componentes estructuralmente similares en dichas muestras. Los anticuerpos pueden presentar reactividad cruzada cuando se adoptan a distintos métodos, lo que indica la necesidad de validar los anticuerpos para una aplicación específica. El desarrollo de un sistema de diagnóstico es un proceso largo, pero el presente trabajo sirve como punto de partida para desarrollar otros proyectos.

IX. CONCLUSIONES

- Se caracterizó el reconocimiento de anticuerpos policlonales generados contra regiones específicas de la proteína 6aJL2 mediante ensayos de dot-blot.
- Se identificó un anticuerpo capaz de distinguir la línea germinal $\lambda 6$.
- Se generó un amiloidoma en un modelo murino para caracterizar el reconocimiento de los anticuerpos en muestras de origen biológico.
- No se obtuvieron anticuerpos monoclonales capaces de reconocer la proteína 6aJL2 en ensayos de dot-blot.

REFERENCIAS

1. Boeckmann B, Blatter MC, Famiglietti L, Hinz U, Lane L, et al. 2005. *C R Biol* 328: 882-99
2. Dobson CM. 2004. *Semin Cell Dev Biol* 15: 3-16
3. Dobson CM. 2003. *Nature* 426: 884-90
4. Lazaridis T, Karplus M. 2003. *Biophys Chem* 100: 367-95
5. Murphy KP. 1995. *Methods Mol Biol* 40: 1-34
6. Abrusan G, Marsh JA. 2019. *J Mol Biol* 431: 3871-88
7. Mazal H, Aviram H, Riven I, Haran G. 2018. *Phys Chem Chem Phys* 20: 3054-62
8. Privalov PL, Makhatadze GI. 1993. *J Mol Biol* 232: 660-79
9. Laskowski RA, Luscombe NM, Swindells MB, Thornton JM. 1996. *Protein Sci* 5: 2438-52
10. Yang L, Adam C, Nichol GS, Cockroft SL. 2013. *Nat Chem* 5: 1006-10
11. Hornby JA, Codreanu SG, Armstrong RN, Dirr HW. 2002. *Biochemistry* 41: 14238-47
12. Zhu H, Sommer I, Lengauer T, Domingues FS. 2008. *PLoS One* 3: e1926
13. Iram A, Naeem A. 2014. *Cell Biochem Biophys* 70: 51-61
14. Stefani M, Dobson CM. 2003. *J Mol Med (Berl)* 81: 678-99
15. Zaman M, Khan AN, Wahiduzzaman, Zakariya SM, Khan RH. 2019. *Int J Biol Macromol* 134: 1022-37
16. Monsellier E, Chiti F. 2007. *EMBO Rep* 8: 737-42
17. Begum T, Ghosh TC. 2010. *J Mol Evol* 71: 60-9
18. Buck PM, Kumar S, Singh SK. 2013. *PLoS Comput Biol* 9: e1003291
19. Bemporad F, Ramazzotti M. 2017. *Int Rev Cell Mol Biol* 329: 1-47
20. Foy SG, Wilson BA, Bertram J, Cordes MHJ, Masel J. 2019. *Genetics* 211: 1345-55
21. Devitt G, Rice W, Crisford A, Nandhakumar I, Mudher A, Mahajan S. 2019. *ACS Chem Neurosci* 10: 4593-611
22. Adams BM, Oster ME, Hebert DN. 2019. *Protein J* 38: 317-29
23. Powers ET, Balch WE. 2013. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 237-48
24. Lyon MS, Milligan C. 2019. *Neurosci Lett* 711: 134462
25. Goodsell DS. 2003. *Stem Cells* 21: 509-10
26. Jayaraj GG, Hipp MS, Hartl FU. 2020. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12
27. Nam SM, Jeon YJ. 2019. *Cancers (Basel)* 11
28. Kurtishi A, Rosen B, Patil KS, Alves GW, Moller SG. 2019. *Mol Neurobiol* 56: 3676-89
29. Pande M, Srivastava R. 2019. *Eur J Med Chem* 184: 111753
30. D'Aguanno V, Ralli M, Artico M, Russo FY, Scarpa A, et al. 2019. *Clin Rev Allergy Immunol*
31. Bustamante JG, Gossman WG. 2019. In *StatPearls*. Treasure Island (FL)
32. Hazenberg BP. 2013. *Rheum Dis Clin North Am* 39: 323-45
33. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda SI, Merlini G, et al. 2016. *Amyloid* 23: 209-13
34. Chiti F, Dobson CM. 2017. *Annu Rev Biochem* 86: 27-68
35. Del Pozo-Yauner L, Becerril, B., Ochoa-Leyva, L., Rodríguez-Ambriz, S. L., Pérez Carrión, J. I., Zavala-Padilla, G., Sánchez-López, R., Fernández Velasco, D.A. 2015. In *Physical Biology of Proteins and Peptides*, ed. G-LO Olivares-Quiroz L., Jardón-Valadez H. , pp. 1-28. Switzerland: Springer, Cham
36. Alexandrescu AT. 2005. *Protein Sci* 14: 1-12
37. Poirier J. 2000. *Ann N Y Acad Sci* 924: 81-90
38. Bales KR, Dodart JC, DeMattos RB, Holtzman DM, Paul SM. 2002. *Mol Interv* 2: 363-75, 39
39. Kisilevsky R. 2000. *Amyloid* 7: 23-5
40. Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, et al. 1994. *Nature* 367: 338-45
41. Magnus JH, Stenstad T, Husby G. 1994. *Baillieres Clin Rheumatol* 8: 575-97
42. Lyubchenko YL. 2015. *AIMS Mol Sci* 2: 190-210
43. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. 2014. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 384-96
44. Ferreira ST, De Felice FG, Chapeaurouge A. 2006. *Cell Biochem Biophys* 44: 539-48
45. Iannuzzi C, Maritato R, Irace G, Sirangelo I. 2013. *Int J Mol Sci* 14: 14287-300
46. Thompson AJ, Barrow CJ. 2002. *Curr Med Chem* 9: 1751-62

47. Muchowski PJ. 2002. *Neuron* 35: 9-12
48. Chiti F, Dobson CM. 2006. *Annu Rev Biochem* 75: 333-66
49. Hartl FU. 2017. *Annu Rev Biochem* 86: 21-6
50. Thirumalai D, Reddy G. 2011. *Nat Chem* 3: 910-1
51. Jahn TR, Radford SE. 2005. *FEBS J* 272: 5962-70
52. Fitzpatrick AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, et al. 2013. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5468-73
53. Kad NM, Myers SL, Smith DP, Smith DA, Radford SE, Thomson NH. 2003. *J Mol Biol* 330: 785-97
54. Khurana R, Ionescu-Zanetti C, Pope M, Li J, Nielson L, et al. 2003. *Biophys J* 85: 1135-44
55. Ionescu-Zanetti C, Khurana R, Gillespie JR, Petrick JS, Trabachino LC, et al. 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13175-9
56. Morris KL, Serpell LC. 2012. *Methods Mol Biol* 849: 121-35
57. Tillement JP, Lecanu L, Papadopoulos V. 2010. *Pharmacology* 85: 1-17
58. Lavatelli F, di Fonzo A, Palladini G, Merlini G. 2016. *EuPA Open Proteom* 11: 4-10
59. Palladini G, Merlini G. 2013. *Eur J Intern Med* 24: 729-39
60. Frame NM, Kumanan M, Wales TE, Bandara A, Fandrich M, et al. 2020. *J Mol Biol*
61. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. 2009. *Cell Mol Life Sci* 66: 9-26
62. Buxbaum JN. 2019. *Amyloid* 26: 55-65
63. Desport E, Bridoux F, Sirac C, Delbes S, Bender S, et al. 2012. *Orphanet J Rare Dis* 7: 54
64. Bellotti V, Mangione P, Merlini G. 2000. *J Struct Biol* 130: 280-9
65. Enqvist S, Sletten K, Westermark P. 2009. *J Pathol* 219: 473-80
66. Wiernik PH. 2001. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 19: 395-424
67. Stevens FJ, Solomon A, Schiffer M. 1991. *Biochemistry* 30: 6803-5
68. Merlini G. 2017. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017: 1-12
69. Schneider M, Hilschmann N. 1975. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 356: 507-57
70. Herrinton LJ. 1996. *Curr Top Microbiol Immunol* 210: 389-95
71. Ramirez-Alvarado M. 2012. *Curr Top Med Chem* 12: 2523-33
72. Poshusta TL, Sikkink LA, Leung N, Clark RJ, Dispenzieri A, Ramirez-Alvarado M. 2009. *PLoS One* 4: e5169
73. Helms LR, Wetzel R. 1996. *J Mol Biol* 257: 77-86
74. Hurle MR, Helms LR, Li L, Chan W, Wetzel R. 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5446-50
75. Comenzo RL, Wally J, Kica G, Murray J, Ericsson T, et al. 1999. *Br J Haematol* 106: 744-51
76. Solomon A, Frangione B, Franklin EC. 1982. *J Clin Invest* 70: 453-60
77. Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, Allmer C, Kyle RA, et al. 2003. *Blood* 101: 3801-8
78. Perfetti V, Casarini S, Palladini G, Vignarelli MC, Klersy C, et al. 2002. *Blood* 100: 948-53
79. del Pozo Yauner L, Ortiz E, Sanchez R, Sanchez-Lopez R, Guereca L, et al. 2008. *Proteins* 72: 684-92
80. Garay Sanchez SA, Rodriguez Alvarez FJ, Zavala-Padilla G, Mejia-Cristobal LM, Cruz-Rangel A, et al. 2017. *Biol Chem* 398: 477-89
81. Gonzalez-Andrade M, Becerril-Lujan B, Sanchez-Lopez R, Cecena-Alvarez H, Perez-Carreón JI, et al. 2013. *FEBS J* 280: 6173-83
82. Gillmore JD, Wechalekar A, Bird J, Cavenagh J, Hawkins S, et al. 2015. *Br J Haematol* 168: 207-18
83. Mollee P, Renaut P, Gottlieb D, Goodman H. 2014. *Intern Med J* 44: 7-17
84. Dispenzieri A, Gertz MA, Buadi F. 2012. *Blood Rev* 26: 137-54
85. Rosenzweig M, Landau H. 2011. *J Hematol Oncol* 4: 47
86. Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ, Grogan M, Coelho T, et al. 2015. *J Am Coll Cardiol* 66: 2451-66
87. Melo Alves J, Marto N. 2018. *N Engl J Med* 378: 2321
88. Maturana-Ramirez A, Ortega AV, Labbe FC, de Moraes E, Aitken-Saavedra JP. 2018. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 119: 514-7
89. Winkler JK, Toberer F. 2019. *Br J Dermatol* 181: e60
90. Lee HJ, Chang SE, Lee MW, Choi JH, Moon KC. 2008. *J Dermatol* 35: 371-2

91. Outteryck O, Stojkovic T, Launay D, Meignie-Ramon B, Vermersch P. 2007. *Acta Derm Venereol* 87: 544-5
92. Gertz MA. 2011. *Am J Hematol* 86: 180-6
93. Nuvolone M, Merlini G. 2017. *Nephrol Dial Transplant* 32: 770-80
94. Joseph NS, Kaufman JL. 2018. *Curr Hematol Malig Rep* 13: 212-9
95. Cai Y, Xu S, Li N, Li S, Xu G. 2019. *Front Pharmacol* 10: 1601
96. Gonzalez Suarez ML, Zhang P, Nasr SH, Sathick IJ, Kittanamongkolchai W, et al. 2019. *Kidney Int* 96: 1005-9
97. Li T, Huang X, Cheng S, Zhao L, Ren G, et al. 2017. *PLoS One* 12: e0185078
98. Gertz MA. 2014. *Am J Hematol* 89: 1132-40
99. Castano E, Palmer MB, Vigneault C, Luciano R, Wong S, Moeckel G. 2015. *BMC Nephrol* 16: 64
100. Leung N, Nasr SH, Sethi S. 2012. *Blood* 120: 3206-13
101. Novak L, Cook WJ, Herrera GA, Sanders PW. 2004. *Nephrol Dial Transplant* 19: 3050-3
102. Schonland SO, Hegenbart U, Bochtler T, Mangatter A, Hansberg M, et al. 2012. *Blood* 119: 488-93
103. Lohani S, Schuiteman E, Garg L, Yadav D, Zarouk S. 2016. *Case Rep Nephrol* 2016: 8690642
104. Comenzo RL, Zhou P, Fleisher M, Clark B, Teruya-Feldstein J. 2006. *Blood* 107: 3489-91
105. Dattilo PB. 2009. *Cases J* 2: 9295
106. Sun L, Zhang L, Hu W, Li TF, Liu S. 2017. *Medicine (Baltimore)* 96: e8771
107. Rocken C, Hegenbarth V, Schmitz M, Stix B, Schade G, et al. 2000. *Virchows Arch* 436: 336-44
108. Hernandez-Reyes J, Galo-Hooker E, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Arguelles GJ. 2012. *Rev Invest Clin* 64: 604-8
109. Ruiz-Delgado GJ, Gomez Rangel JD. 2004. *Gac Med Mex* 140: 375-9
110. Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ, Aguilar-Romero L. 2004. *Arch Med Res* 35: 163-7
111. Pinney JH, Smith CJ, Taube JB, Lachmann HJ, Venner CP, et al. 2013. *Br J Haematol* 161: 525-32
112. Kyle RA, Larson DR, Kurtin PJ, Kumar S, Cerhan JR, et al. 2019. *Mayo Clin Proc* 94: 465-71
113. Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. 2018. *Blood Adv* 2: 1046-53
114. Nienhuis HL, Bijzet J, Hazenberg BP. 2016. *Kidney Dis (Basel)* 2: 10-9
115. Potapov V, Sobolev V, Edelman M, Kister A, Gelfand I. 2004. *J Mol Biol* 342: 665-79
116. Solomon A. 1986. *Blood* 68: 603-10
117. Solomon A, Weiss DT. 1995. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 387-94
118. Solomon A, Weiss DT, Macy SD, Antonucci RA. 1990. *Am J Pathol* 137: 855-62
119. Retter I, Althaus HH, Munch R, Muller W. 2005. *Nucleic Acids Res* 33: D671-4
120. Lefranc MP. 2003. *Nucleic Acids Res* 31: 307-10
121. Lefranc MP. 2001. *Exp Clin Immunogenet* 18: 161-74
122. Lefranc MP. 2001. *Exp Clin Immunogenet* 18: 242-54
123. del Pozo Yauner L, Ortiz E, Becerril B. 2006. *Proteins* 62: 122-9
124. Milstein C. 1986. *Science* 231: 1261-8
125. Heinrich G, Traunecker A, Tonegawa S. 1984. *J Exp Med* 159: 417-35
126. Selsing E, Storb U. 1981. *Cell* 25: 47-58
127. Jatou JC, Riesen W. 1976. *Ann Immunol (Paris)* 127: 273-83
128. Chien N, Giusti AM, Zack D, French D, Shin SU, et al. 1986. *Mt Sinai J Med* 53: 181-6
129. Diamond B, Chien N, Scharff M. 1985. *Ann Inst Pasteur Immunol (1985)* 136C: 267-71
130. Griffiths GM, Berek C, Kaartinen M, Milstein C. 1984. *Nature* 312: 271-5
131. Gearhart PJ. 1983. *Ann N Y Acad Sci* 418: 171-6
132. Bhat A, Selmi C, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. 2010. *Clin Rev Allergy Immunol* 38: 97-106
133. Blancas-Mejia LM, Tischer A, Thompson JR, Tai J, Wang L, et al. 2014. *J Mol Biol* 426: 347-61
134. Davis DP, Gallo G, Vogen SM, Dul JL, Sciarretta KL, et al. 2001. *J Mol Biol* 313: 1021-34
135. Vidal R, Goni F, Stevens F, Aucouturier P, Kumar A, et al. 1999. *Am J Pathol* 155: 2009-17
136. Wall JS, Gupta V, Wilkerson M, Schell M, Loris R, et al. 2004. *J Mol Recognit* 17: 323-31

137. Bodi K, Prokaeva T, Spencer B, Eberhard M, Connors LH, Seldin DC. 2009. *Amyloid* 16: 1-8
138. Mahmood S, Wassef NL, Salter SJ, Sachchithanantham S, Lane T, et al. 2016. *Am J Clin Pathol* 146: 78-85
139. Kourelis TV, Dasari S, Theis JD, Ramirez-Alvarado M, Kurtin PJ, et al. 2017. *Blood* 129: 299-306
140. Wall J, Schell M, Murphy C, Hrnčić R, Stevens FJ, Solomon A. 1999. *Biochemistry* 38: 14101-8
141. Pokkuluri PR, Solomon A, Weiss DT, Stevens FJ, Schiffer M. 1999. *Amyloid* 6: 165-71
142. Ruiz-Zamora RA, Guillaume S, Al-Hilaly YK, Al-Garawi Z, Rodriguez-Alvarez FJ, et al. 2019. *Sci Rep* 9: 3123
143. Foss GS, Nilsen R, Cornwell GC, 3rd, Husby G, Sletten K. 1998. *Scand J Immunol* 47: 348-54
144. Fykse EM, Sletten K, Husby G, Cornwell GG, 3rd. 1988. *Biochem J* 256: 973-80
145. Omtvedt LA, Husby G, Cornwell GG, 3rd, Kyle RA, Sletten K. 1997. *Scand J Immunol* 45: 551-6
146. Tveteraas T, Sletten K, Westermarck P. 1985. *Biochem J* 232: 183-90
147. Buxbaum J. 1992. *Hematol Oncol Clin North Am* 6: 323-46
148. Kourelis T, Murray DL, Dasari S, Kumar S, Barnidge D, et al. 2018. *Am J Hematol* 93: E368-E70
149. Quittot N, Sebastiao M, Bourgault S. 2017. *Biochem Cell Biol* 95: 329-37
150. McLaughlin RW, De Stigter JK, Sikkink LA, Baden EM, Ramirez-Alvarado M. 2006. *Protein Sci* 15: 1710-22
151. Blancas-Mejia LM, Hammernik J, Marin-Argany M, Ramirez-Alvarado M. 2015. *J Biol Chem* 290: 4953-65
152. Martin DJ, Ramirez-Alvarado M. 2011. *Biophys Chem* 158: 81-9
153. Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, Granzow M, Benner A, et al. 2015. *J Clin Oncol* 33: 1371-8
154. Bryce AH, Ketterling RP, Gertz MA, Lacy M, Knudson RA, et al. 2009. *Haematologica* 94: 380-6
155. Blancas-Mejia LM, Tellez LA, del Pozo-Yauner L, Becerril B, Sanchez-Ruiz JM, Fernandez-Velasco DA. 2009. *J Mol Biol* 386: 1153-66
156. del Pozo-Yauner L, Wall JS, Gonzalez Andrade M, Sanchez-Lopez R, Rodriguez-Ambriz SL, et al. 2014. *Biochem Biophys Res Commun* 443: 495-9
157. Maya-Martinez R, Gil-Rodriguez P, Amero C. 2015. *Biochem Biophys Res Commun* 456: 695-9
158. Fahey JL. 1965. *JAMA* 194: 71-4
159. Alzari PM, Lascombe MB, Poljak RJ. 1988. *Annu Rev Immunol* 6: 555-80
160. Cotton RG. 1985. *Med Res Rev* 5: 77-106
161. Huber R. 1984. *Behring Inst Mitt*: 1-14
162. Poljak RJ. 1991. *Mol Immunol* 28: 1341-5
163. Ada GL. 1966. *Australas Ann Med* 15: 17-23
164. Wilson IA, Stanfield RL, Rini JM, Arevalo JH, Schulze-Gahmen U, et al. 1991. *Ciba Found Symp* 159: 13-28; discussion -39
165. Tainer JA, Deal CD, Geysen HM, Roberts VA, Getzoff ED. 1991. *Int Rev Immunol* 7: 165-88
166. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. 2005. *ILAR J* 46: 258-68
167. Leenaars M, Hendriksen CF. 2005. *ILAR J* 46: 269-79
168. Leenaars PP, Hendriksen CF, de Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, et al. 1999. *Altern Lab Anim* 27: 79-102
169. Kohler G, Milstein C. 1975. *Nature* 256: 495-7
170. Liu JK. 2014. *Ann Med Surg (Lond)* 3: 113-6
171. Grazioli L, Germain V, Weiss A, Acuto O. 1998. *J Biol Chem* 273: 8916-21
172. Perlman R, Bottaro DP, White MF, Kahn CR. 1989. *J Biol Chem* 264: 8946-50
173. Posnett DN, McGrath H, Tam JP. 1988. *J Biol Chem* 263: 1719-25
174. Clerici E, Schechter I, Sela M. 1970. *Immunology* 19: 267-75
175. Schulze-Gahmen U, Prinz H, Glatzer U, Beyreuther K. 1985. *EMBO J* 4: 1731-7
176. Imajoh-Ohmi S, Tokita K, Ochiai H, Nakamura M, Kanegasaki S. 1992. *J Biol Chem* 267: 180-4
177. Fischer PM, Howden ME. 1993. *Int J Pept Protein Res* 41: 415-9
178. Hirayama A, Takagaki Y, Karush F. 1985. *J Immunol* 134: 3241-7
179. Sytkowski AJ, Wojchowski DM. 1985. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 707-13
180. Mata AM, Matthews I, Tunwell RE, Sharma RP, Lee AG, East JM. 1992. *Biochem J* 286 (Pt 2): 567-80

181. Nakagawa M, Ohmido N, Ishikawa K, Uchiyama S, Fukui K, Azuma T. 2008. *J Biochem* 143: 325-32
182. Riveros-Moreno V, Beddell C, Moncada S. 1993. *Eur J Biochem* 215: 801-8
183. Shen S, Strobel HW. 1994. *Biochemistry* 33: 8807-12
184. Neurath AR, Strick N, Jiang S. 1992. *Virology* 188: 1-13
185. Sesti G, Tullio AN, Marini MA, Manera E, Borboni P, et al. 1994. *Mol Cell Endocrinol* 101: 121-7
186. Langedijk JP, Back NK, Durda PJ, Goudsmit J, Meloen RH. 1991. *J Gen Virol* 72 (Pt 10): 2519-26
187. Kerr PJ, Fitzgerald S, Tregear GW, Dalgarno L, Weir RC. 1992. *Virology* 187: 338-42
188. White JM, Wilson IA. 1987. *J Cell Biol* 105: 2887-96
189. Smith MH, Barber BH. 1990. *Mol Immunol* 27: 169-80
190. Kim SK, Ragupathi G, Musselli C, Choi SJ, Park YS, Livingston PO. 1999. *Vaccine* 18: 597-603
191. Furkert J, Dolling R, Liebermann H, Penke B. 1990. *Arch Exp Veterinarmed* 44: 873-81
192. Ding L, Meng Y, Zhang HY, Yin WC, Yan Y, Cao YP. 2016. *Neurosci Lett* 634: 1-6
193. Borel H, Sasaki T, Stollar DB, Borel Y. 1984. *J Immunol Methods* 67: 289-302
194. Yoshikawa T, Kato Y, Yuki N, Yabe T, Ishida H, Kiso M. 2008. *Glycoconj J* 25: 545-53
195. Layton GT, Stanworth DR, Amos HE. 1987. *Mol Immunol* 24: 133-41
196. Tam JP. 1989. *Methods Enzymol* 168: 7-15
197. Manki A, Ono T, Uenaka A, Seino Y, Nakayama E. 1998. *Cancer Res* 58: 1960-4
198. Liao ZL, Luo G, Xie X, Tang XD, Bai JY, et al. 2013. *Int Immunopharmacol* 16: 444-50
199. Amin N, Pupo M, Aguilar A, Vazquez S, Caballero Y, et al. 2016. *Asian Pac J Trop Med* 9: 130-3
200. Barbouche R, Decroly E, Kieny MP, Fenouillet E. 2000. *Virology* 273: 169-77
201. Francis MJ, Hastings GZ, Brown F, McDermed J, Lu YA, Tam JP. 1991. *Immunology* 73: 249-54
202. Ravin NV, Blokhina EA, Kuprianov VV, Stepanova LA, Shaldjan AA, et al. 2015. *Vaccine* 33: 3392-7
203. Zhang L, Miao L, Gong X, Zhang H, Yang L, et al. 2013. *J Pept Sci* 19: 491-8
204. Christodoulides M, Heckels JE. 1994. *Microbiology* 140 (Pt 11): 2951-60
205. Wang R, Charoenvit Y, Corradin G, Porrozzi R, Hunter RL, et al. 1995. *J Immunol* 155: 1637
206. Le TP, Church LW, Corradin G, Hunter RL, Charoenvit Y, et al. 1998. *Vaccine* 16: 305-12
207. Gonzalez-Villasenor LI, Chen TT. 1999. *Mar Biotechnol (NY)* 1: 211-20
208. Yang HW, Ikeda H, Kato K, Nakagawara A, Choi SH, et al. 1999. *J Pediatr Surg* 34: 454-60
209. Caponi L, Pegoraro S, Di Bartolo V, Rovero P, Revoltella R, Bombardieri S. 1995. *J Immunol Methods* 179: 193-202
210. Briand JP, Barin C, Van Regenmortel MH, Muller S. 1992. *J Immunol Methods* 156: 255-65
211. Ma QL, Lim GP, Harris-White ME, Yang F, Ambegaokar SS, et al. 2006. *J Neurosci Res* 83: 374-84
212. Kaye R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, et al. 2007. *Mol Neurodegener* 2: 18
213. Wang XP, Zhang JH, Wang YJ, Feng Y, Zhang X, et al. 2009. *FEBS Lett* 583: 579-84
214. Zhang X, Sun XX, Xue D, Liu DG, Hu XY, et al. 2011. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1703-12
215. Murakami K. 2014. *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 1293-305
216. Glabe CG. 2008. *J Biol Chem* 283: 29639-43
217. Glabe CG. 2004. *Trends Biochem Sci* 29: 542-7
218. Kaye R, Glabe CG. 2006. *Methods Enzymol* 413: 326-44
219. O'Nuallain B, Wetzell R. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1485-90
220. O'Nuallain B, Allen A, Kennel SJ, Weiss DT, Solomon A, Wall JS. 2007. *Biochemistry* 46: 1240-7
221. Hrnčić R, Wall J, Wolfenbarger DA, Murphy CL, Schell M, et al. 2000. *Am J Pathol* 157: 1239-46
222. Solomon A, Weiss DT. 1987. *J Immunol* 139: 824-30
223. Walker MR, Solomon A, Weiss DT, Deutsch HF, Jefferis R. 1988. *J Immunol* 140: 1600-4
224. Abe M, Goto T, Kennel SJ, Wolfenbarger D, Macy SD, et al. 1993. *Am J Clin Pathol* 100: 67-74
225. Solomon A, Weiss DT, Wall JS. 2003. *Cancer Biother Radiopharm* 18: 853-60
226. Chakravarthy M, Chen S, Dodd PR, Veedu RN. 2017. *Theranostics* 7: 3933-47
227. Cui Z, Bu W, Fan W, Zhang J, Ni D, et al. 2016. *Biomaterials* 104: 158-67

228. Bolognesi ML, Gandini A, Prati F, Uliassi E. 2016. *J Med Chem* 59: 7759-70
229. Bongarzone S, Staderini M, Bolognesi ML. 2014. *Future Med Chem* 6: 1017-29
230. Radnia F, Mohajeri N, Zarghami N. 2020. *Talanta* 209: 120547
231. Hsieh PL, Liao YW, Pichler M, Yu CC. 2020. *Cancers (Basel)* 12
232. Zhang Y, Huang K, Lin J, Huang P. 2019. *Biomater Sci* 7: 1262-75
233. Nimmagadda S, Penet MF. 2019. *Front Oncol* 9: 1537
234. Mukherjee A, Paul M, Mukherjee S. 2019. *Cancers (Basel)* 11
235. Lecocq Q, De Vlaeminck Y, Hanssens H, D'Huyvetter M, Raes G, et al. 2019. *Theranostics* 9: 7772-91
236. Dhandapani R, Sethuraman S, Subramanian A. 2019. *J Control Release* 299: 21-30
237. Cattaneo M, Froio A, Gallino A. 2019. *Eur Cardiol* 14: 62-4
238. Madav Y, Barve K, Prabhakar B. 2020. *Eur J Pharm Sci* 145: 105240
239. Xiao S, Tang Y, Lv Z, Lin Y, Chen L. 2019. *J Control Release* 316: 302-16
240. Li J, Cha R, Luo H, Hao W, Zhang Y, Jiang X. 2019. *Biomaterials* 223: 119474
241. Dwan BF, Moore A, Wang P. 2019. *Transl Res* 214: 50-61
242. Anwar A, Siddiqui R, Khan NA. 2019. *ACS Chem Neurosci* 10: 6-12
243. Lecocq L, Wiegand T, Rodriguez-Alvarez FJ, Cadalbert R, Herrera GA, et al. 2019. *Chembiochem* 20: 1027-31
244. Chau, C. H., Rixe, O., McLeod, H., Figg, W. D., Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 5967–5976.
245. Juncker, D., Bergeron, S., Laforte, V., Li, H., Cross-reactivity in antibody microarrays and multiplexed sandwich assays: shedding light on the dark side of multiplexing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014, 18, 29–37.
246. Ellington, A.A., Kullo, I.J., Bailey, K.R., Klee, G.G., Antibody- based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin. Chem.* 2010, 56, 186–193.
247. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl.* 2015 Apr;9(3-4):406-22
248. Menter T, Bachmann M, Grieshaber S, Tzankov A: A More Accurate Approach to Amyloid Detection and Subtyping: Combining in situ Congo Red Staining and Immunohistochemistry. *Pathobiology* 2017;84:49-55.
249. Maritschnegg E, Heinzl N, Wilson S, Deycmar S, Niebuhr M, Klameth L, Holzer B, Koziel K, Concin N, Zeillinger R. Polymer-Ligand-Based ELISA for Robust, High-Throughput, Quantitative Detection of p53 Aggregates. *Anal Chem.* 2018 Nov 20;90(22):13273-13279.