



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
“Francisco García Salinas”

Unidad Académica de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

***Obtención y caracterización de bioconjugados de metotrexato
para la producción de anticuerpos***

*Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Química*

Presenta:

QFB Luis Fernando López Valdez

Directores:

Dr. Guillermo Quiñones Reyes

Dra. María de los Ángeles Hernández Ruíz

Tutor:

Dra. Susana Godina González

Diciembre 2019

Agradecimientos

Agradezco a la Maestría de Ciencia y Tecnología Química de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Zacatecas por la oportunidad de cursar mis estudios de maestría y en especial al Dr. Quiñones y la Dra. Godina por permitirme desarrollar este proyecto de tesis.

Hago extensivo mi agradecimiento al Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Facultad de Química de la universidad de Valencia en España, al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) de Valencia España por las facilidades para realizar mi estancia de investigación, así como al Dr. Francesc A. Esteve-Turrillas, Dr. Antonio Abad Somovilla, Dr Antonio Abad Fuentes y al Dr Josep Vicent Mercader Badia por el espacio en su laboratorio, y por vigilar de cerca los resultados y hacer más amena mi estancia.

De igual manera agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad de estudiar en un posgrado del Programa Nacional de Programas de Calidad (PNPC).

*Gracias a Dios por llevarme al lugar y con las personas correctas.
Gracias a mis padres y a toda mi familia por el gran ejemplo y motivación a lo largo de
mi vida.*

*A tí Ivone, por ser mi motivación y soporte incondicional en todo momento al paso de
estos años. Sin tu presencia, el recorrido por este camino no hubiera sido igual, cada
experiencia única de aprendizaje fue disfrutada y aprovechada al máximo*

*A todo los integrantes del laboratorio de Síntesis de Bioconjugados por los momentos
académicos y personales, que marcaron esta etapa de mi vida.*

*A Guillermo y Susana por abrirme las puertas
de sus laboratorios, por el entusiasmo,
y por hacerme sentir que estoy
en el lugar correcto.*

Gracias!

Índice

	<i>Página</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>v</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>Vii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>vii</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>Abstract</i>	<i>2</i>
<i>1. Introducción</i>	<i>3</i>
<i>1.1 Metotrexato</i>	<i>4</i>
<i>1.2 Propiedades químicas y farmacocinéticas del metotrexato</i>	<i>7</i>
<i>1.3 Métodos de análisis de metotrexato</i>	<i>9</i>
<i>1.3.1 Métodos cromatográficos</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2 Métodos de reconocimiento molecular</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3 Producción de anticuerpos</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3.1 Inmunoensayos tipo ELISA</i>	<i>13</i>
<i>1.3.3.2 Formatos utilizados en el desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA</i>	<i>14</i>
<i>1.3.3.3 Interpretación de datos obtenidos de un ensayo tipo ELISA</i>	<i>17</i>
<i>1.3.3.4 Métodos inmunoenzimáticos para la determinación de MTX</i>	<i>19</i>
<i>1.4 Obtención de anticuerpos hacia MTX</i>	<i>20</i>
<i>1.4.1 Síntesis de haptenos y preparación de conjugados proteicos</i>	<i>21</i>
<i>2 Hipótesis</i>	<i>27</i>
<i>2.1 Objetivos</i>	<i>27</i>
<i>3. Materiales y métodos</i>	<i>28</i>
<i>3.1.1 Síntesis de haptenos del metotrexato</i>	<i>28</i>
<i>3.1.1.1 Síntesis del éster activo de metotrexato</i>	<i>29</i>
<i>3.1.2 Preparación de bioconjugados proteicos</i>	<i>30</i>
<i>3.1.2.1 Preparación de los conjugados inmunogénicos con BSA</i>	<i>30</i>
<i>3.1.2.2 Preparación de conjugados de tapizado con OVA</i>	<i>31</i>
<i>3.1.2.3 Preparación de trazadores enzimáticos con HRP</i>	<i>31</i>
<i>3.2 Análisis de conjugados proteicos por MALDI-TOF-MS</i>	<i>32</i>
<i>3.3 Producción de anticuerpos policlonales</i>	<i>32</i>
<i>3.3.1 Inmunización de conejos</i>	<i>32</i>
<i>3.3.2 Obtención de antisueros de conejo</i>	<i>33</i>
<i>3.4 Análisis mediante ELISA</i>	<i>33</i>
<i>3.4.1 Inmunoensayo para la detección de metotrexato</i>	<i>34</i>
<i>3.4.1.1 ELISA competitivo de conjugado inmovilizado (formato indirecto)</i>	<i>34</i>
<i>3.4.1.2 ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado (formato directo)</i>	<i>34</i>
<i>3.4.1.3 Procesamiento de señal y curvas de inhibición</i>	<i>35</i>
<i>4. Resultados y discusión</i>	<i>37</i>
<i>4.1 Diseño de los haptenos</i>	<i>37</i>
<i>4.1.1 Síntesis de haptenos del MTX y preparación de bioconjugados</i>	<i>40</i>
<i>4.1.2 Preparación del bioconjugado inmunizante de BSA</i>	<i>41</i>
<i>4.1.3 Preparación del bioconjugado de ensayo</i>	<i>46</i>

4.1.4	<i>Preparación del bioconjugado de señalización de HRP</i>	49
4.2	<i>Viabilidad de los bioconjugados de MTX</i>	52
4.2.1	<i>Desempeño del bioconjugado mtx-C-BSA</i>	53
5	<i>Conclusiones</i>	58
6	<i>Referencias</i>	61
	<i>Anexos</i>	68

Índice de figuras.

	Página
Figura 1	Estructuras químicas del ácido fólico (a), estructura del MTX (b). 5
Figura 2	Mecanismo de acción del metotrexato. 6
Figura 3	Unidades principales de la estructura del MTX, anillo de pteridina (a) anillo de p-aminobenzóico (b) y la unidad de ácido glutámico (c). 7
Figura 4	Estructuras químicas de los principales metabolitos del MTX, el 7-hidroxi metotrexato (a) y DAMPA (b). 8
Figura 5	Representación esquemática de una inmunoglobulina tipo IgG. 12
Figura 6	Representación esquemática de las etapas de un inmunoensayo ELISA con formato sándwich.(a) Tapizado con anticuerpos (Ab), (b) reacción entre el analito y el Ab, (c) acoplamiento de un segundo anticuerpo marcado al complejo Ab-Analito, (d) lavado y generación de señal con el anticuerpo marcado. 15
Figura 7	Esquema de inmunoensayo competitivo, (a) competencia entre los Ab de tapizado y 2do Ab por la unión con el antígeno, (b) generación de la unión Ab-antígeno para la generación de señal. 15
Figura 8	Formatos de inmunoensayos ELISA directos. (a) El pocillo se tapiza con el Ab y se hace reaccionar con el antígeno marcado. (b) Formación del complejo Ab-antígeno marcado después de la unión listo para la generación de señal. (c) El pocillo es tapizado con el antígeno y se hace reaccionar con un anticuerpo marcado. (d) Complejo antígeno-Ab marcado formado. 16
Figura 9	Esquema de inmunoensayo tipo ELISA formato Indirecto. (a) En este formato después del tapizado se hace reaccionar el antígeno con un primer Ab específico al antígeno. (b) Después de la formación del complejo antígeno-Ab se agrega un segundo anticuerpo marcado específico para el primer Ab, para así lograr la generación de señal. 17
Figura 10	Curva típica de un inmunoensayo de tipo competitivo 18
Figura 11	Esquema de funcionalidades químicas utilizadas en acoplamientos covalentes para la formación de (a) amidas, (b) tioéteres e (c) hidrazonas. 21
Figura 12	Activación del grupo carboxilato mediada por (a) diazoacetatos y (b) N,N'-carbonil diimidazol. 22
Figura 13	Activación del grupo carboxilato utilizando una carbodiimida. 23
Figura 14	Activación mediada por (a) DSC y (b) Cloroformiato de NHS. 23
Figura 15	Formación de complejo biotina-estreptavidina. 26
Figura 16	Formación del éster activo de NHS-MTX 30
Figura 17	Curva de inhibición típica donde se indican algunos parámetros. 35
Figura 18	Estructuras de los haptenos a) mtx-C, b) mtx-N y c) mtx-pG indicando el punto de anclaje del brazo espaciador. 39
Figura 19	Esquema de obtención de los diferentes bioconjugados del hapteno mtx-C. 40
Figura 20	Formación del éster activo de NHS-MTX 41

<i>Figura 21</i>	<i>Síntesis del bioconjugado de MTX-BSA.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 22</i>	<i>Espectros UV/Vis del MTX (verde), la proteína BSA (naranja) y el bioconjugado mtx-C-BSA (azul).</i>	<i>42</i>
<i>Figura 23</i>	<i>Espectros de masas de la proteína BSA y dos bioconjugados mtx-C-BSA.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 24</i>	<i>Síntesis del bioconjugado de mtx-C-OVA</i>	<i>46</i>
<i>Figura 25</i>	<i>Espectros de absorción UV/Vis del hapteno mtx-C (morado), OVA (rojo) y el bioconjugado mtx-C-OVA (verde).</i>	<i>47</i>
<i>Figura 26</i>	<i>Comparación de los espectros de masas de la proteína OVA (azul) y el bioconjugado mtx-C-OVA (verde).</i>	<i>49</i>
<i>Figura 27</i>	<i>Síntesis del bioconjugado de mtx-C-HRP</i>	<i>50</i>
<i>Figura 28</i>	<i>Espectro de absorción UV/Vis del conjugado mtx-C-HRP</i>	<i>50</i>
<i>Figura 29</i>	<i>Comparación de los espectros de masas para la referencia de la enzima HRP (azul) y el bioconjugado mtx-C-HRP (verde).</i>	<i>52</i>
<i>Figura 30</i>	<i>Placa de inmunoensayo c-ELISA directo, en el cual no se observa una inhibición definida utilizando concentraciones de mtx-C-HRP de 1000 y 600 ng/mL.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 31</i>	<i>Placa de inmunoensayo c-ELISA indirecto, con tapizado a 1 µg/mL de mtx-C-OVA</i>	<i>55</i>
<i>Figura 32</i>	<i>Curva de inhibición del inmunoensayo c-ELISA indirecto con pAb B dilución 1:1000</i>	<i>56</i>
<i>Figura 33</i>	<i>Curva de inhibición del inmunoensayo c-ELISA indirecto con pAb B 1:500</i>	<i>57</i>

índice de tablas

	<i>Página</i>
<i>Tabla 1 Principales fármacos monitoreados en hospitales</i>	<i>4</i>
<i>Tabla 2 Dosificación del MTX para diversos tratamientos</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 3 Clases de anticuerpos y número de paratopos</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 4 Esquema de inmunizaciones</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 5 Solubilidad del metotrexato</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 6 Absorbancias del hapteno mtx-C</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 7 Coeficientes de extinción molar para el hapteno mtx-C</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 8 Coeficientes de extinción molar para la proteína BSA</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 9 Carga hapténica del conjugado mtx-C-BSA obtenida por UV-vis</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 10 Coeficientes de extinción molar para la proteína OVA</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 11 Carga hapténica del conjugado mtx-C-OVA obtenida por espectroscopia UV/Vis.</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 12 Coeficientes de extinción molar para la proteína HRP y valor de densidad hapténica en el bioconjugado HRP-mtx-C calculada por UV/Vis</i>	<i>51</i>

Abreviaturas

MTX	Metotrexato
COFEPRIS	Comisión Nacional para la Protección contra Riesgos Sanitarios
MFT	Monitorización Terapéutica de Fármacos
MTX-PG	Metotrexato Poliglutamato
DAMPA	Ácido-4-amino-desoxi-10N-metilpteroico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
GC	Cromatografía de Gases
CZE	Electroforesis de Zona Capilar
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HPLC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrómetro de masas
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FPIA	Inmunoensayo de Polarización por Fluorescencia
CMIA	Inmunoensayo de Micropartículas Quimioluminiscentes
BSA	Albúmina de suero bovino
OVA	Ovoalbúmina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
RMN	Resonancia magnética nuclear
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MeCN	Acetonitrilo
K _d	Coefficiente de Partición
CDI	Cloroformiato de N-Hidroxisuccinimidilo
MeOH	Metanol
μmol	Micro moles
μl	Micro litros
μg	Microgramos
nM	Nano moles
L	Litros
DMF	N,N'-Dimetilformamida
RM _f	Relación Molar final
RM ₀	Relación Molar Inicial
DSC	carbonato de N,N'-disuccimidilo
Et ₃ N	triethylamina
pAbs	Anticuerpos policlonales

Resumen

Los métodos analíticos para la identificación y cuantificación de metotrexato (MTX) se han diversificado y mejorado notablemente. Entre todos ellos, los métodos inmunoenzimáticos se han posicionado de manera sobresaliente debido a que son procedimientos que presentan prestaciones analíticas importantes en términos de sensibilidad, especificidad y potencial para tratar un gran número de muestras, a un costo relativamente inferior que aquéllas de índole instrumental. En este trabajo, se abordó la obtención de bioconjugados proteicos del MTX (BSA, OVA y HRP) y su caracterización, para ser utilizados como inmunorreactivos para la eventual producción de anticuerpos e identificación de MTX en ensayos inmunoenzimáticos en plataforma sólida tipo ELISA. Al objeto de realizar la conjugación proteica, se aprovecharon los carboxilatos disponibles en la estructura del MTX y los grupos $-NH_2$ libres de los restos de lisina en las proteínas correspondientes. Etapa que implicó la formación del éster activo de MTX utilizando 1.3 equivalentes de carbonato de *N,N'*-disuccimidilo y 3.8 equivalentes de trietilamina en DMF anhidra. La obtención de los conjugados inmunizantes de mtx-C-BSA, de ensayo mtx-C-OVA y de señalización mtx-C-HRP, se prepararon a partir de disoluciones acuosas de la proteína correspondiente, en buffer de carbonatos 50 mM pH 9.6 y la adición del éster activo del hapteno del MTX. La determinación de la carga hapténica se realizó por UV/Vis y espectrometría de masas MALDI-TOF para cada uno de los bioconjugados resultando: 5.5 haptenos/ BSA que se utilizó como bioconjugado de inmunización, 3.0 haptenos/OVA para emplearse como conjugado de tapizado, y finalmente una relación de un hapteno por HRP, mismo que se empleó como trazador enzimático. Se aplicó un protocolo de inmunización en conejo hembra New Zealand blanco utilizando el bioconjugado inmunizante de mtx-C-BSA, y el suero policlonal se valoró a través de ensayos ELISA competitivos tanto en formato directo como indirecto que permitieron evaluar la afinidad de los anticuerpos policlonales hacia MTX con valores de IC_{50} del orden 3 nM. De esta manera, se comprobó la viabilidad de los bioconjugados proteicos del MTX preparados. No obstante, a las cargas hapténicas bajas de los bioconjugados preparados, se accedió satisfactoriamente a un lote de anticuerpos policlonales de conejo que exhibieron curvas de inhibición, con valores de IC_{50} cercanos a 3 nM permitiendo encontrar las condiciones óptimas para establecer un inmunoensayo c-ELISA en formato indirecto para la identificación del metotrexato en una matriz acuosa.

Abstract

The analytical methods for the identification and quantification of methotrexate (MTX) have been diversified and greatly improved. Among all of them, immunoenzymatic methods have positioned themselves in an outstanding way because they are procedures that have important analytical performance in terms of sensitivity, specificity and ability to process a large number of samples, at a relatively lower cost than those of an instrumental nature. In this work, the obtaining of MTX protein bioconjugates (BSA, OVA and HRP) and their characterization were approached, to be used as immunoreactive agents for the eventual production of antibodies and identification of MTX in immunoenzymatic tests on solid ELISA type platform. In order to carry out the protein conjugation, the carboxylates available in the MTX structure and the free $-NH_2$ groups of the lysine residues in the corresponding proteins were used. A stage that involved the formation of the active MTX ester using 1.3 equivalents of *N,N'*-disuccimidyl carbonate and 3.8 equivalents of triethylamine in anhydrous DMF. Obtaining the immunizing conjugates of mtx-C-BSA, mtx-C-OVA assay and mtx-C-HRP signaling, were prepared from aqueous solutions of the corresponding protein, in 50 mM carbonate buffer pH 9.6 and the addition of the hapten active ester of MTX. The characterization of the haptic load was carried out by UV/Vis and MALDI-TOF mass spectrometry for each of the bioconjugates resulting: 5.5 haptens/BSA that was used as immunization bioconjugate, 3.0 haptens/OVA to be used as upholstery conjugate, and finally a ratio of one hapten to HRP, which was used as an enzyme tracer. An immunization protocol was applied in white New Zealand female rabbit using the mtx-C-BSA immunizing bioconjugate, and the polyclonal serum was assessed through competitive ELISA assays in both direct and indirect format that allowed to evaluate the affinity of polyclonal antibodies to MTX with IC_{50} values of the order 3 nM. In this way, the viability of the prepared MTX protein bioconjugates was checked. However, at a low haptic loading of the prepared bioconjugates, a batch of rabbit polyclonal antibodies that exhibited inhibition curves, with IC_{50} values close to 3 nM were satisfactorily allowed to find the optimal conditions to establish a c-ELISA immunoassay in indirect format for the identification of methotrexate in an aqueous matrix.

1. Introducción

La regulación farmacocinética y de farmacodinamia de los medicamentos en nuestro país se realiza por la *Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)* con un programa de farmacovigilancia bajo la presunción, la efectividad de los fármacos se encuentran contrastados con su potencial de generar reacciones adversas con su consiguiente riesgo en la salud.¹ Las intoxicaciones medicamentosas se han transformado en un problema de salud pública, puesto que ocasionan un número importante de accesos a unidades de terapia intensiva.²

En este contexto, el monitoreo de la concentración de algunos fármacos de uso común en la práctica clínica, necesita que se lleve de forma sistemática. Con el propósito de adecuar la correcta dosificación, y así, lograr el efecto deseado minimizando el riesgo de efectos tóxicos.³

La monitorización terapéutica de fármacos (*MFT o TDM por sus siglas en inglés Therapeutic Drug Monitoring*), es una herramienta que ha permitido optimizar la disminución de los efectos tóxicos y elevando la eficiencia de los tratamientos. Asimismo, en los medicamentos que presentan un limitado rango terapéutico o con un perfil de efectos adversos permitiría la delimitar los tratamientos farmacéuticos.⁴

Si bien podría pensarse que todos los fármacos deberían de monitorearse, no todos son candidatos de mediciones, por tal razón, los criterios que son considerados para que los fármacos puedan ser candidatos de medición son: estrecho margen terapéutico, alta variabilidad farmacocinética, efecto farmacológico difícil de medir y disponer de una metodología analítica para la rápida obtención del resultado.⁵ Entre los grupos de fármacos que se pueden monitorear se encuentran anticonvulsivos, antimicrobianos, digitálicos e inmunosupresores que se presentan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Principales fármacos monitoreados en hospitales.

Grupo	Fármaco	Tipo de muestra
Inmunosupresores	Metotrexato	Suero
	Sirolimus	Sangre total
	Tacrolimus	Sangre total
Anticonvulsivos	Ácido valproico	Suero
	Carbamazepina	Suero
Antimicrobianos	Fenobarbital	Suero
	Amikacina	Suero o plasma
	Gentamicina	Suero o plasma
	Vancomicina	Suero o plasma
Digitálicos	Digoxina	Suero

Los fármacos inmunosupresores son agentes químicos que producen una disminución en la actividad del sistema inmunitario, no obstante, estos medicamentos no están libres de efectos adversos o secundarios debido a que la mayoría de ellos no actúan de modo selectivo, produciendo efectos de inhibición celular, apoptosis y efectos citostáticos.⁶ Los efectos citostáticos generados por este grupo de fármacos son variables entre los cuales se presentan el bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la generación de nucleósidos, aplasia y la alteración del organismo para el aprovechamiento del ácido fólico para el crecimiento celular. Existen diferentes tipos de fármacos citostáticos que difieren entre sí por su efecto farmacológico entre los cuales se encuentra la azatioprina, ácido micofenólico, ciclofosfamida y el metotrexato.⁶

1.1 Metotrexato

El *metotrexato* (MTX) (4-amino-10-metilfolato, 4-amino-10-metil pteroil-L-glutamato), un análogo estructural y antagonista del ácido fólico (**Figura 1**), es un fármaco quimioterápico empleado con frecuencia en oncología infantil, en enfermedades autoinmunes y la interrupción del embarazo, debido a su notable interferencia en la proliferación celular.⁷

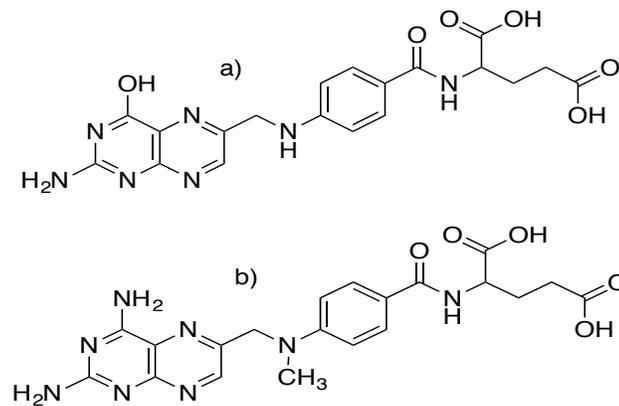


Figura 1. Estructuras químicas del ácido fólico (a), estructura del MTX (b).

El MTX se emplea exitosamente por el potencial que presenta para la inhibición competitiva de la DHF *dihidrofolato-reductasa*, su efecto principal es la modificación del ácido fólico en tetrahidrofolato, el cual es componente esencial para la transferencia de un átomo de carbono en diversas rutas metabólicas. Entre los procesos donde se reflejan estos efectos se encuentran el crecimiento celular, producción nucleótidos del ADN y RNA, síntesis de ácido timidílico y como efecto más importante se identifica la restricción de la timidilato-sintasa ocasionando el bloqueo de la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular o prolongando el ingreso desde G1 a S. (**Figura 2**).⁸ Los tejidos que reflejan un efecto inhibitorio son aquellos que presentan un crecimiento celular acelerado y una elevada actividad metabólica, además, estos efectos dependen de la cantidad de MTX intracelular. Primordialmente, los tejidos que se presentan estos efectos son células neoplásicas, células epiteliales del tracto digestivo, células de la medula ósea y los folículos capilares.^{3,7}

A pesar de la eficacia terapéutica del MTX para una amplia variedad de enfermedades y padecimientos, el tratamiento con metotrexato puede presentar un riesgo para el paciente. En particular, por la capacidad del MTX de interferir en los procesos requeridos para la replicación del material genético y la división celular tanto de células normales como enfermas; niveles inapropiadamente altos del fármaco pueden conducir a la destrucción de tejidos no diana que proliferan activamente como la médula ósea y mucosa intestinal.⁹

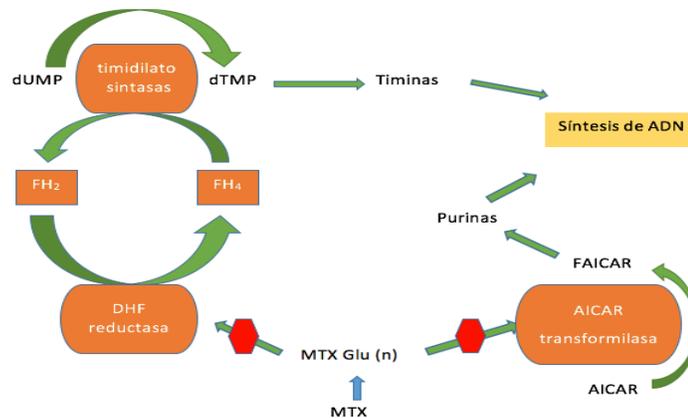


Figura 2. Mecanismo de acción del metotrexato.
Adaptado de Goicoechea García Carlos, 2016.⁸

Se ha asociado al MTX con toxicidad renal y hepática cuando se administra en el “régimen de dosis altas” que se requiere para algunos padecimientos (**Tabla 2**).¹⁰ Además, en algunos pacientes el tratamiento con MTX, a dosis bajas, puede conducir a toxicidad y efectos secundarios no deseados, sobre todo cuando la dosificación no es apropiada ya sea, por no contar con un sistema de cuantificación del nivel sérico de MTX en laboratorio, o debido a la variabilidad individual en los parámetros farmacocinéticos que influyen, por ejemplo, en la absorción y aclaramiento del fármaco. Esta situación es especialmente problemática en la terapia de padecimientos crónicos tales como la artritis reumatoide, en la que el MTX puede administrarse durante un periodo de muchos años.¹⁰

A pesar de que se ha documentado que se cuentan con varias medidas de atención de apoyo para prevenir la toxicidad, como suspender los medicamentos que interfieren con el aclaramiento del MTX, hiperhidratación, alcalinización de la orina y la administración de ácido fólico o glucarpidasa son insuficientes como medidas de prevención, ya que se conoce que la administración de MTX a dosis bajas y altas generan toxicidad grave, como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad pulmonar, toxicidad hematológica y toxicidad gastrointestinal, motivos por los cuales el monitoreo terapéutico del fármaco es de suma importancia para anticipar la terapia de rescate para prevenir los efectos adversos mencionados anteriormente.^{8,11}

Tabla 2. Dosificación del MTX para diversos tratamientos.

Enfermedad	Dosis	Tiempo	Refuerzo
Leucemia linfocítica aguda	3.3 mg/m ² i.m. 1-10 mg/m ²	4-6 semanas	20-30 mg/m ² i.m. 2.5mg/Kg cada 14 días o 30 mg/m ² mensuales i.m. 200 mg/m ²
Linfoma de células T	2.5-10 mg/día 50 mg/semana i.v 50 mg a la semana i.v	4-6 semanas	
Psoriasis	30 mg	semanalmente	
Artritis reumatoide	20 mg	semanalmente	
Enfermedades neoplásicas	80-900 mg/Kg 900-30000 mg/Kg		

1.2 Propiedades químicas y farmacocinéticas del metotrexato

La síntesis del MTX fue un proceso racional donde se buscaba un compuesto capaz de bloquear el efecto del ácido fólico, motivo por el cual la estructura química del MTX es muy semejante al ácido fólico (**ver Figura 1**), salvo en dos puntos: el grupo 4 hidroxilo del anillo pteridínico del ácido es reemplazado por un grupo amino y el nitrógeno de la posición 10 tiene acoplado un metilo, estas modificaciones permiten que el MTX muestre mayor afinidad por la *DHF-reductasa* que el propio ácido fólico⁷, la molécula es constituida por tres unidades claves que son un anillo de pteridina, un *ácido p-aminobenzoico* y una unidad de *ácido glutámico* (**Figura 3**).¹²

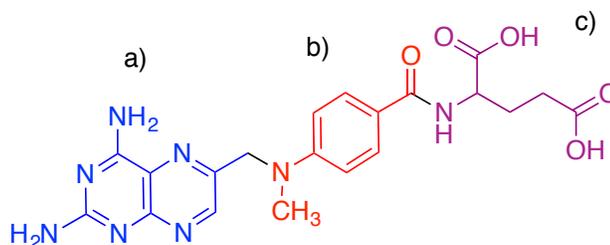


Figura 3. Unidades principales de la estructura del MTX, anillo de pteridina (a) anillo de p-aminobenzoico (b) y la unidad de ácido glutámico (c).

El MTX es un polvo cristalino de color amarillo a marrón anaranjado, es inodoro, su punto de fusión oscila entre 182-189 °C, es inflamable, higroscópico, presenta gran

estabilidad pero es sensible a luz, es incompatible con ácidos fuertes o agentes oxidantes fuertes, presenta una gran solubilidad en soluciones de carbonato de metales alcalinos y en disoluciones alcalinas diluidas dado que el metotrexato tiene dos grupos carboxilo, con respecto a los disolventes orgánicos la solubilidad mostrada es muy ligera o nula.¹³ El carácter hidrofílico del MTX le impide atravesar la membrana celular, por lo cual requiere de un sistema de transporte específico como el transportador de folatos reducidos, ya dentro de la célula el MTX se convierte a *metotrexato poliglutamato (MTX-PG)* por acción de la enzima folilpoliglutamato sintetasa, el cual no difunde de manera fácil al espacio extracelular y es acumulado de modo intracelular.^{14,15} Motivo por el cual, posteriormente del reparto a través de los tejidos se pueden encontrar cantidades elevadas del MTX-PG durante semanas o meses.³

El MTX se metaboliza por dos vías, un 10 % de la dosis es transformado en el hígado, entre los metabolitos que se generan está el *7-hidroximetotrexato*, el cual mantiene un efecto terapéutico prolongado del MTX, por otro lado, el *ácido 4-amino-desoxi-N10-metilpteroico (DAMPA)* se obtiene por el metabolismo del MTX en el intestino mediante la acción de la microbiota **(Figura 4)**.^{3,16}

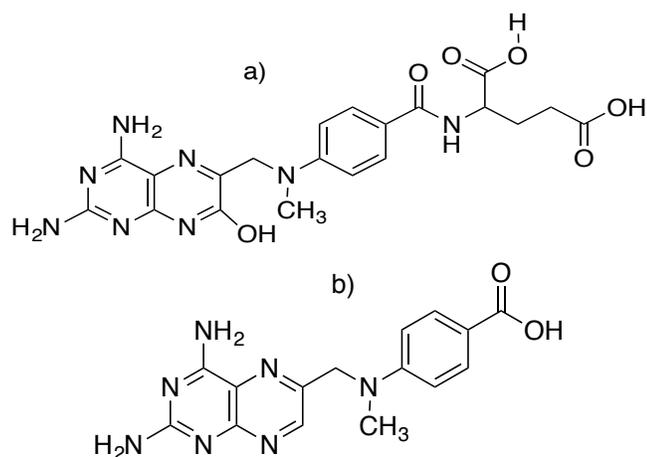


Figura 4. Estructuras químicas de los principales metabolitos del MTX, el 7-hidroximetotrexato (a) y DAMPA (b).

La vía renal es la principal ruta de excreción para el MTX, otras vías secundaria son la filtración glomerular y la secreción del túbulo proximal, además, de la eliminación de

algunos metabolitos por vía biliar.¹⁷ El uso de ciertos fármacos a la par del MTX reducen la eliminación renal del MTX y sus metabolitos, aumentando el riesgo de toxicidad.^{3,16}

La estabilidad que presenta el MTX y sus metabolitos en la orina generan una problemática para su monitoreo, este problema surge a raíz de los procedimientos previos a la medición que suelen generar resultados erróneos, entre los principales factores que afectan a los métodos analíticos para el monitoreo de MTX se encuentran el tiempo de almacenamiento de las muestras antes de su análisis y la temperatura de congelación.¹⁸

1.3 Métodos de análisis de metotrexato

Actualmente, el monitoreo de la concentración terapéutica del MTX en la práctica clínica, requiere de un control cuidadoso de las concentraciones plasmáticas, especialmente en los protocolos de dosis altas y de rescate con ácido folínico.⁸ La considerable mejora y amplia variedad de las técnicas analíticas para la cuantificación e identificación del MTX, el cual se puede medir en muestras biológicas mediante técnicas analíticas como cromatografía, bioensayos y métodos inmunoenzimáticos, cada uno de los cuales presenta sus propias ventajas en términos de sensibilidad, especificidad, velocidad, costo y nivel de capacitación requerida.^{8,16,17}

1.3.1 Métodos cromatográficos

El análisis químico de muestras complejas en solución generalmente implica la separación de una muestra seguida de la identificación y cuantificación del analito, entre las técnicas más comunes de separación se ubican la *electroforesis de zona capilar (CZE)*, *cromatografía de gases (GC)* y *la cromatografía líquida (LC)*. Estas técnicas de separación se pueden combinar con diferentes plataformas de detección química, incluidos dispositivos microfluídicos, espectrometría de masas (MS) y técnicas de espectrometría UV-vis y fluorescencia.¹⁹ Se han desarrollados métodos de *cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)* que utilizan detección fluorométrica, pero estos métodos son propensos a la interferencia de folatos, lo que los hace vulnerables a interpretaciones erróneas, así como a la reducción de la sensibilidad.²⁰

Una variante cromatográfica utilizada en el monitoreo de MTX es HPLC acoplada a un detector UV/Vis, sin embargo, a pesar de su alto nivel de sensibilidad, la absorción

UV/Vis adolece la falta de especificidad para los analitos.^{16, 21} El MTX es una sustancia absorbente en UV/Vis fuerte, debido a la presencia del cromóforo pterino heteroaromático, y los máximos de absorción dependen en gran medida del pH de la fase móvil, el límite inferior de detección alcanzado para MTX varía entre 20 y 200 nM en muestras biológicas, esto dependerá del grado de enriquecimiento de la muestra alcanzado durante la preparación de la muestra.⁸

Una de las técnicas de mayor sensibilidad, ampliamente utilizada y aceptada por las USEPA ("*United States Environmental Protection Agency*" Agencia de protección del Medio Ambiente de Estados Unidos por sus siglas en inglés) como método oficial es la HPLC MS/MS.²² Algunas de las prestaciones de HPLC MS/MS son su límite de cuantificación de 5 nM, una desproteinización simple, el efecto de matriz por efecto de suero no es observado, la sensibilidad de esta técnica es de 1000 a 2000 veces más que HPLC-UV y el efecto cruzado con estructuras análogas a la de MTX no influye en esta técnica.²² La necesidad de gestionar eficazmente la dosificación y prevención de los daños a la salud, genera un compromiso para disponer de técnicas analíticas fidedignas y rápidas para el control del MTX. Con este fin, las técnicas basadas en la identificación molecular se presentan como una alternativa de gran potencial que proporcionarían toma de decisiones y medidas prevención seguras.²³

1.3.2 Métodos de reconocimiento molecular

Los escenarios con poca o nula dotación instrumental, tiempo y un número considerable de muestras, requiere de alternativas para el procesamiento de las mismas, es aquí, donde las metodologías fundamentadas en receptores, ya sean proteínas de membrana, aptámeros, polímeros de impresión molecular y primordialmente anticuerpos son consideradas como una opción importante.²⁴ La afinidad, la unión específica, reversible y no covalente entre la sustancia de detectar y una inmunoglobulina son los principios de las técnicas inmunoanalíticas. Los ensayos de flujo lateral, columnas de inmunoafinidad, biosensores, tiras inmunorreactivas, microarrays y muy especialmente ensayos tipo ELISA, son adaptación para los anticuerpos que generan diversos formatos analíticos.²⁴

1.3.3 Producción de anticuerpos

Las inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos, son proteínas circulantes en sangre que integran la familia de las gamma-globulinas generadas por las células B o linfocitos B, estos anticuerpos se producen en respuesta al contacto con moléculas extrañas llamadas antígenos, los anticuerpos son muy variados y particulares en su potencial para identificar esqueletos moleculares extraños como bacterias, virus y toxinas, además, disponen de la facultad para seleccionar entre diversos antígenos y pueden unirse con una gran afinidad y especificidad.²⁵ La eficacia de la respuesta inmune se debe al poderío de los mecanismos específicos que contrarrestan a los elementos. El sistema inmune de los vertebrados es apto para poner en marcha mecanismos de neutralización específica de los elementos extraños que ingresan al organismo, así como de originar células de memoria productoras de anticuerpos orientados selectivamente hacia cada antígeno, que se accionarán después de una nueva exposición, generando una respuesta de defensa más eficiente. La forma característica de los anticuerpos luce semejante a la letra Y.

La representación esquemática clásica de una inmunoglobulina en particular la de tipo G se muestra en la **figura 5**.²⁵ La estructura básica de una inmunoglobulina está formada por dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (de 25 kDa cada una) y dos cadenas polipeptídicas pesadas (de 50 kDa cada una) también idénticas. Las cadenas pesadas se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro, y cada una, a su vez, se une a una cadena ligera, también mediante puentes disulfuro. Además, las dos cadenas pesadas están asociadas a polisacáridos. Los anticuerpos presentan tres dominios bien diferenciados. El dominio *Fc* (*fragment crystallizable*) forma la base de la inmunoglobulina y pertenecen a la zona *C-terminal* de las cadenas pesadas. Esta porción tiene una función importante en la activación de la respuesta inmune, esto se debe a la composición de la misma por aminoácidos constantes y regiones de glicosilación. La porción *Fab* (*fragment antigen binding*) están constituidas por la porción *N-terminal* de las cadenas pesadas y ligeras, estos fragmento *Fab* son semejantes y conforman los brazos de la Y, adicionalmente, los inmunoglobulinas son estructuras bifuncionales, esto se debe, a la disponibilidad de zonas variables que constituyen el paratopo o región del antígeno.²⁶

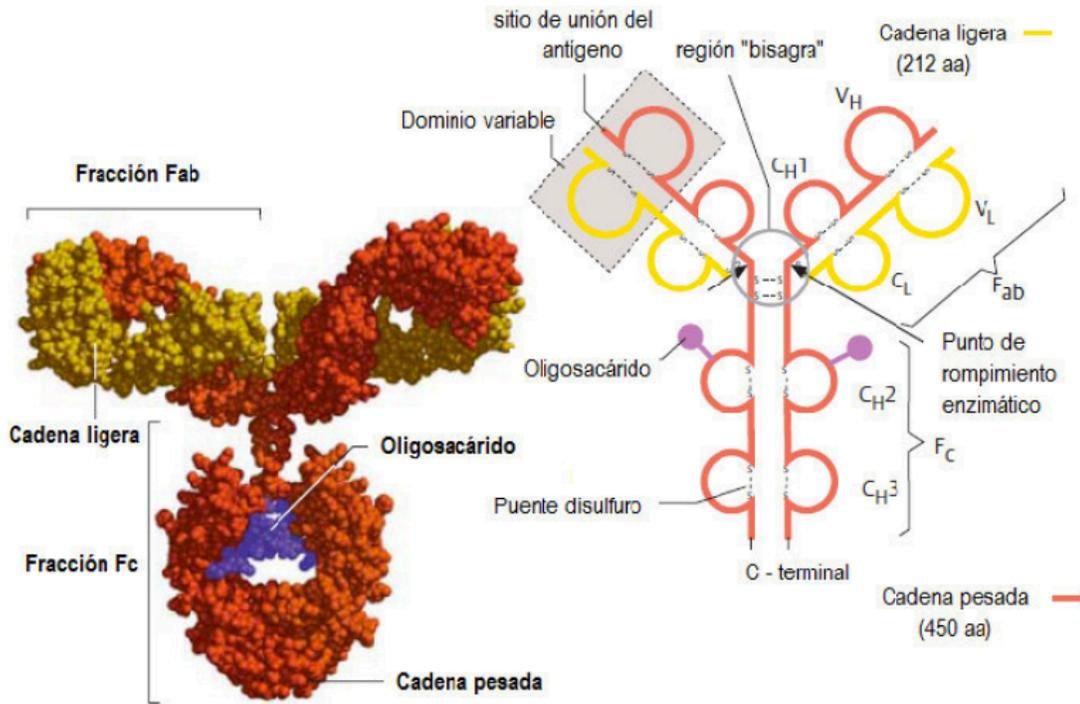
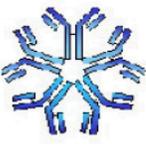
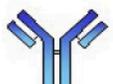
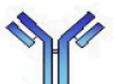


Figura 5. Inmunoglobulina tipo IgG representación del esqueleto.. (Imagen adaptada de www.visualscience.ru)

La composición de los anticuerpos se caracteriza por ser constante en su mayor parte y solamente el margen de los fragmentos *Fab* exhiben regiones variables (*VL* y *VH*). La interacción con el antígeno se genera en esta zona, además, de proporcionar una gran versatilidad a pesar de que es la porción más pequeña para la actividad del anticuerpo.²⁵ En función de su estructura las inmunoglobulinas se categorizan en cinco isotipos o clases (*diversos tipos de cadena pesada: α , μ , γ , δ , ϵ , diferente composición de aminoácidos, tamaño y carga*), instante en la que surge la respuesta, actividad funcional y región donde se pueden ubicar (leche, suero, saliva, etc.): *IgG, IgA, IgM, IgD e IgE*. La cadena pesada es la única que precisa la subclase a la que pertenecen, independientemente que las cadenas ligeras sean de tipo κ o λ . La longitud de la zona de “bisagra” y el número de puentes disulfuro son utilizados para diferenciar los subtipos de anticuerpos. Por otro lado, el número de antígenos que se pueden unir a los anticuerpos dependen del número de las zonas *Fab* de la inmunoglobulina (**Tabla 3**).^{25,26}

Tabla 3. Clases de anticuerpos y número de paratopos.

	Clases de anticuerpos				
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadena pesada	γ	α	μ	δ	ε
Cadena ligera	K o λ	K o λ	K o λ	K o λ	K o λ
Estructura					

La IgG es el subtipo de anticuerpo que se encuentra en mayor proporción en el suero sanguíneo, asimismo, estos presentan afinidad, especificidad y son los únicos que se presentan en respuestas secundarias hacia el paratopo.

1.3.3.1 Inmunoensayos tipo ELISA

Los inmunoensayos *ELISA* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se caracteriza por que unos de los reactivos (*antígeno o anticuerpo*) se inmoviliza en una placa multipocillo, por otro lado, la señal se genera por una reacción enzimática.²⁴ Los inmunoensayos ELISA convencionales han asumido un rol de caballo de batalla en la detección cualitativa y cuantitativa de analitos en muestras heterogéneas durante más de 50 años.²⁷ Además el desarrollo de anticuerpos ha facilitado la generación de ensayos altamente robustos, basados en anticuerpos, con una proclividad de estandarización y automatización.²⁶ La capacidad de la técnica para detectar niveles bajos tanto de anticuerpos como su antígeno afín llevó a proponer que tales ensayos tendrían una ventaja particular para el uso rutinario en muestras clínicas porque es simple, sensible, objetivo, se realiza rápidamente y su lectura requiere solo una pequeña cantidad de muestra.²⁷ De manera expresa, instancias oficiales sugieren el uso de inmunoensayos guiados a la detección de MTX.²⁴ Una prueba de ello es el número de empresas que distribuyen ensayos modelo kit para la detección de MTX (Enzo Life Sciences, My BioSource, Abcam, ARK Diagnostics, Neogen,...).

1.3.3.2 Formatos utilizados en el desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA

La clasificación de los inmunoensayos enzimáticos se lleva a cabo de forma general en dos grupos el primero de ellos corresponde a los métodos enzimáticos heterogéneos y el segundo a métodos enzimáticos homogéneos. En el caso de los métodos homogéneos de inmunoensayos enzimáticos, las enzimas empleadas se inactivan al momento de la unión con el anticuerpo y, por tanto, el antígeno no es separado del medio debido a la ausencia de una etapa de lavado. Este método es empleado para medir sustancias en pequeñas cantidades ya que posee una facilidad en su uso.²⁹ Los métodos heterogéneos usados frecuentemente, se caracterizan por evitar la interferencia de cualquier molécula en el medio después de la unión antígeno y el anticuerpo, los complejos formados se encuentran unidos a las paredes de soporte y es eliminada del medio cualquier otra cosa que no sea el complejo a través de lavados. Este método enzimático presenta mayor sensibilidad que el homogéneo, además permite detectar anticuerpos específicos y antígenos solubles. Las principales variantes de los métodos homogéneos y heterogéneos se presentan en la variabilidad de formatos para el desarrollo del inmunoensayo ELISA, entre los más utilizados se pueden encontrar el formato directo e indirecto, competitivos y sándwich.^{29,30}

El formato sándwich fue desarrollado en 1977 por Kato y sus colaboradores.³¹ En este método, los pocillos de la placa son recubiertos con un anticuerpo de captura, después de esto se agregada la muestra a los pocillos, la placa es incubada durante algún tiempo y se lava. Después del lavado, se agregan e incuban un segundo anticuerpo que se encuentra marcado con una enzima específica y nuevamente se lava la placa (**Figura 6**). Para revelar la actividad de la enzima, se añade un sustrato enzimático al medio el cual genera una coloración, esta coloración es muestra de un resultado positivo y la ausencia de coloración es indicativo de un resultado negativo por ausencia de enzimas.³¹ Este formato es recomendado para la determinación de macromoléculas, debido a que el analito debe presentar dos epítomos diferentes para la unión de los dos anticuerpos.³²

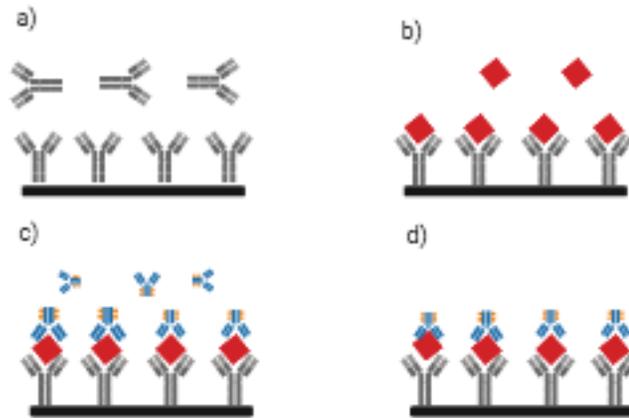


Figura 6. Representación esquemática de las etapas de un inmunoensayo ELISA con formato sándwich. (a) Tapizado con anticuerpos (Ab), (b) reacción entre el analito y el Ab, (c) acoplamiento de un segundo anticuerpo marcado al complejo Ab-Analito, (d) lavado y generación de señal con el anticuerpo marcado.

El inmunoensayo competitivo fue desarrollado por Belanger en 1973.³³ El desarrollo de este formato se da mediante la reacción competitiva entre objetivos en la muestra (antígeno o anticuerpo) y objetivos marcados con enzimas (antígeno o anticuerpo) contra el anticuerpo o antígeno inmovilizado correspondiente.³² En este formato el antígeno (marcado o sin marcar) o las moléculas de anticuerpo compiten entre sí para unirse al anticuerpo o antígeno inmovilizado correspondiente.³² La coloración resultante permite cuantificar la concentración del analito mediante una relación inversamente proporcional entre la cantidad de analito y la intensidad de la coloración.²⁹

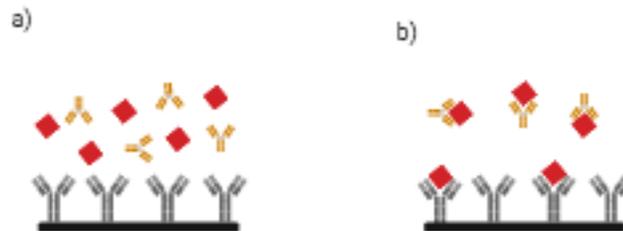


Figura 7. Esquema de inmunoensayo competitivo, (a) competencia entre los Ab de tapizado y 2do Ab por la unión con el antígeno, (b) generación de la unión Ab-antígeno para la generación de señal.

En 1971 Perlmann y Schuurs fueron los primeros en desarrollar el formato ELISA directo, método pionero para otros formatos ELISA.^{34,35} Principalmente, el formato directo es utilizado para determinar analitos de alto peso molecular, para este método la placa es recubierta por anticuerpo o antígeno, la medición se efectúa utilizando un antígeno o anticuerpo marcado que es incubado durante un tiempo constante, después se realiza un lavado para eliminar los antígenos o anticuerpos no unidos al medio, la señal se produce al agregar un sustrato apropiado al medio para producir el desarrollo de coloración en la placa (**Figura 8**).^{31,36}

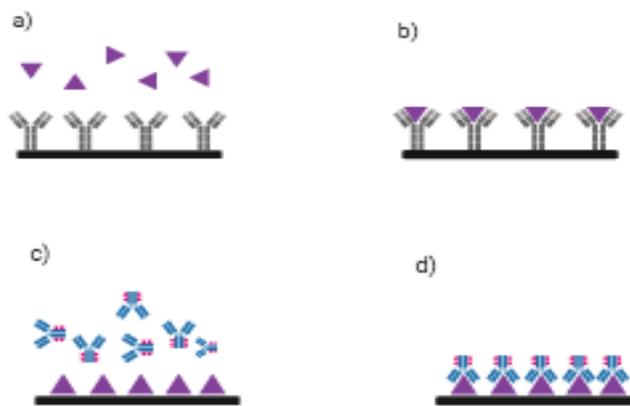


Figura 8. Formatos de inmunoensayos ELISA directos. (a) El pocillo se tapiza con el Ab y se hace reaccionar con el antígeno marcado. (b) Formación del complejo Ab-antígeno marcado después de la unión listo para la generación de señal. (c) El pocillo es tapizado con el antígeno y se hace reaccionar con un anticuerpo marcado. (d) Complejo antígeno-Ab marcado formado.

El formato ELISA indirecto fue desarrollado por Lindström y Wager en 1978.³⁶ La base para este formato fue el ELISA directo para evaluar la presencia de anticuerpos en los sueros.³⁵ En este sistema la microplaca es recubierta con el antígeno, en un segundo paso se agrega el antisuero y se deja reaccionar después de un tiempo se lava la microplaca. El antígeno es detectado de forma indirecta al agregar un anticuerpo secundario marcado que reconoce al anticuerpo primario inmovilizado por su unión al antígeno, para la señal se agrega un sustrato para el desarrollo de color (**Figura 9**). La señal aumenta al incrementar la cantidad de antígeno inmovilizado. Este formato es adecuado para medir

macromoléculas y se puede evaluar la presencia de anticuerpos asociados a algunas enfermedades.^{29,31}

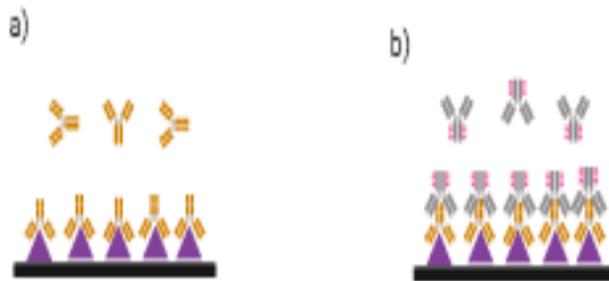


Figura 9. Esquema de inmunoensayo tipo ELISA formato Indirecto. (a) En este formato después del tapizado se hace reaccionar el antígeno con un primer Ab específico al antígeno. (b) Después de la formación del complejo antígeno-Ab se agrega un segundo anticuerpo marcado específico para el primer Ab, para así lograr la generación de señal.

1.3.3.3 Interpretación de datos obtenidos de un ensayo tipo ELISA

Los ensayos ELISA pueden ser diseñados para acceder a información cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa. En el caso de información cualitativa, los ensayos ELISA son utilizados para indicar la presencia de un antígeno particular en una muestra, esta información es interpretada como un resultado positivo o negativo. La información semicuantitativa en ensayos ELISA se utilizan para comparar niveles de antígeno presente en las muestras de ensayo, utilizando como patrón de comparación la intensidad de señal generada en la muestra la cual variará con respecto a la concentración del antígeno. Con respecto a la información cuantitativa, los ensayos ELISA son interpretados con la comparación de una curva estándar (una dilución en serie de un antígeno purificado) para calcular con precisión las concentraciones de un antígeno en múltiples muestras.³⁷

La caracterización mediante inmunoensayo enzimático en placa para moléculas de bajo peso molecular debe realizarse mediante ELISA competitivo. La representación de la intensidad de la señal de un ELISA competitivo en función de la cantidad de analito en escala semilogarítmica proporciona una curva sigmoide (**Figura 10**).³⁸ Esta representación recibe el nombre de curva de inhibición, ya que representa el grado de inhibición de la interacción entre el anticuerpo y conjugado debido a la presencia del analito. Generalmente

una curva de inhibición es asociada con tres parámetros: el primero de ellos la asíntota inferior, que representa la señal mínima ($A_{\text{mín}}$); el segundo es la asíntota superior, correspondiente a la señal máxima del ensayo ($A_{\text{máx}}$); el tercero hace referencia a la cantidad en el punto de inflexión, el cual se sitúa a una cantidad de analito tal que atenúa la señal del ensayo a la mitad del valor de $A_{\text{máx}}$ cuando $A_{\text{mín}}$ tiende a valer cero. Motivo por el cual, la concentración en el punto de inflexión es nombrada IC_{50} , y generalmente se utiliza como estimación numérica de la sensibilidad del ensayo. La IC_{50} puede utilizarse en situaciones limitantes como valoración de la constante de equilibrio de disociación del complejo analito/anticuerpo.³⁸

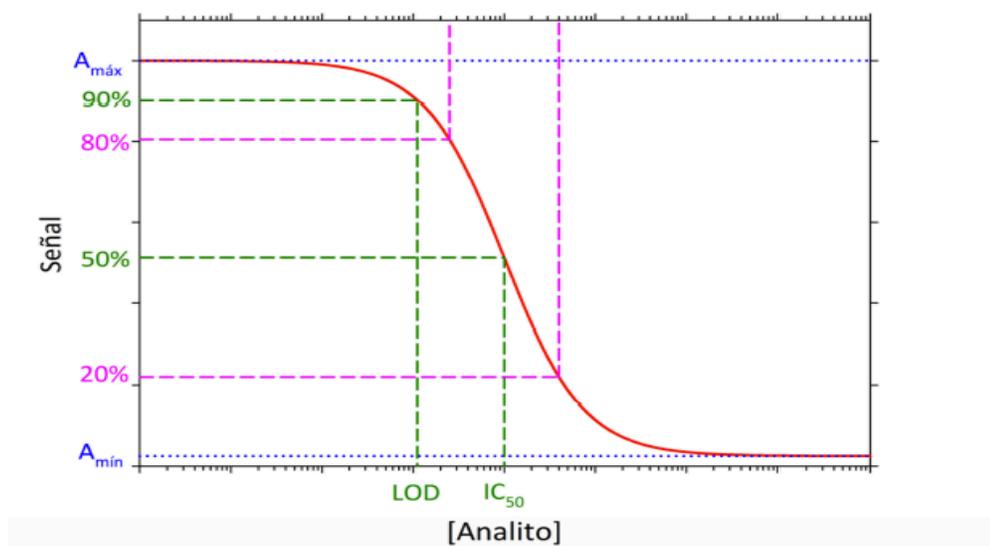


FIGURA 10. Curva típica de un inmunoensayo de tipo competitivo

En un contexto analítico, la curva de inhibición se emplea en un ELISA competitivo como curva de calibración, de manera que tras obtener ésta, a partir de una serie de diluciones de un patrón primario, puede obtenerse la concentración del analito en una muestra por interpolación. El valor de límite de detección (LOD) aceptado para las curvas de inhibición es aquel valor de concentración que reduce la señal un 10% respecto a $A_{\text{máx}}$, mientras que el intervalo o rango de trabajo suele tomarse un intervalo de reducción de señal del 80% al 20% con respecto a $A_{\text{máx}}$.³⁹

1.3.3.4 Métodos Inmunoenzimáticos para la determinación de MTX

En este contexto, existen dos formatos de inmunoensayos utilizados para la detección de MTX, el primero de ellos, es la metodología más empleada para la cuantificación de MTX en el sector clínico, es el *inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPIA)*, un inmunoensayo de tipo competitivo en fase homogénea que puede cuantificar analitos del orden de microgramos a nanogramos; la variante que presenta este inmunoensayo es la forma en que se genera y detecta la señal, en la cual la molécula de señalización es fluorescente y lo que se detecta es la polarización de la luz.⁴²

Actualmente, el FPIA ha sido desplazado como técnica de primera línea para el monitoreo de MTX, en su lugar el inmunoensayo de micro partículas quimioluminiscente (CMIA) está experimentando un ascendente interés, por representa una opción sencilla, asequible, de alta sensibilidad y bajos límites de detección que compiten con el FPIA y HPLC-MS.^{43,44}

Hasta la fecha los inmunoensayos antes mencionados siguen siendo limitados y exhiben problemas de reacción cruzada con algunos metabolitos del MTX como el 7-hidroxi metotrexato y DAMPA. Adicionalmente, la sensibilidad para concentraciones séricas bajas del analito ($< 0.050 \mu\text{mol/L}$), se observa en ocasiones comprometida ocasionando problemas de correlación con técnicas analíticas comparativas como HPLC-MS.^{43,44} Existe por tanto una necesidad, en particular del sector clínico y medioambiental, de desarrollar métodos analíticos que comprendan al menos un anticuerpo de alta sensibilidad para metotrexato, principalmente por medio del uso de un kit que permita de manera confiable, rápida y económica, el análisis en lugares poco dotados tecnológicamente controlar la dosis terapéutica del fármaco.

A la vista de todo lo expuesto, y en una primera etapa, contemplamos como un objetivo científico-tecnológico importante la obtención de haptenos del metotrexato y la correspondiente generación bioconjugados proteicos a objeto de contar con los inmunorreactivos necesarios que eventualmente nos permitan la generación de anticuerpos para el metotrexato, elementos claves para la generación de un kit de inmunoensayo en soporte sólido tipo ELISA. En las próximas secciones se exploran

brevemente los principios científicos y metodologías habituales en la preparación de inmunoensayos para los analitos de diminuto peso molecular.⁴⁵

1.4 Obtención de anticuerpos hacia MTX

Uno de los elementos claves para la generación de inmunoensayos es la existencia de anticuerpos de alta afinidad y selectividad hacia el analito de interés. Para conseguir estas biomoléculas se llevan directrices establecidas y avaladas por su usanza a lo largo de tres décadas. En general, las fases implicadas se pueden establecer de la siguiente forma.^{26,42}

1. Síntesis de haptenos
2. Preparación de conjugados proteicos
3. Producción de anticuerpos
4. Caracterización de anticuerpos

1.4.1 Síntesis de haptenos y preparación de conjugados proteicos

La introducción de inmunoensayos enzimáticos en la práctica clínica tiene como objetivo apoyar el diagnóstico rápido de analitos en matrices biológicas. Para la generación de un inmunoensayo es preciso conseguir los bioconjugados como elementos importantes para las etapas de inmunización y establecimiento de los ensayos.

La bioconjugación implica la unión de una molécula a otra a través de la formación de un enlace covalente, para generar un complejo entre ambas moléculas. La mayoría de los complejos formados contienen una molécula de origen biológico o derivado de una biomolécula; sin embargo, se pueden obtener conjugados completamente sintéticos, pese a que, su uso estará dirigido a aplicaciones biológicas.⁴⁶ La síntesis de bioconjugados puede generar compuestos que tengan proporciones semejantes de cada componente o conjugados que tengan la finalidad de tener más moléculas de un componente en particular. El proceso de síntesis de bioconjugados a partir de moléculas diferentes crea así nuevos complejos que tendrán propiedades combinadas de cada constituyente del que se obtienen, normalmente los componentes creados tienen características que no se encuentran en las sustancias de origen natural.⁴⁶

La formación de un bioconjugado útil se inicia visualizando las características que se desean en el complejo final, para después pasar a elegir los componentes necesarios para crearlos; las funcionalidades que pueden integrarse en los bioconjugados al conectar dos o más moléculas estará limitado por los componentes individuales a unir. Los conjugados pueden contener una o más moléculas, que pueden ser utilizadas para dirigir, capturar o detectar una biomolécula, enzima, toxina, un fármaco u otros componentes que tengan un propósito específico.⁴⁶

La generación de bioconjugados se puede llevar a cabo usando agentes de entrelazamiento, mediante el uso de una funcionalidad química apropiada en una de las moléculas para facilitar la conjugación o usando un agente de activación secundario, generando un grupo químico reactivo intermediario en uno de los componentes a conjugar. La clave para una síntesis exitosa de un bioconjugado se debe a la selección del grupo funcional apropiado que se acoplarán con la funcionalidad química disponible en la molécula a unir entre sí (**Figura 11**).⁴⁶

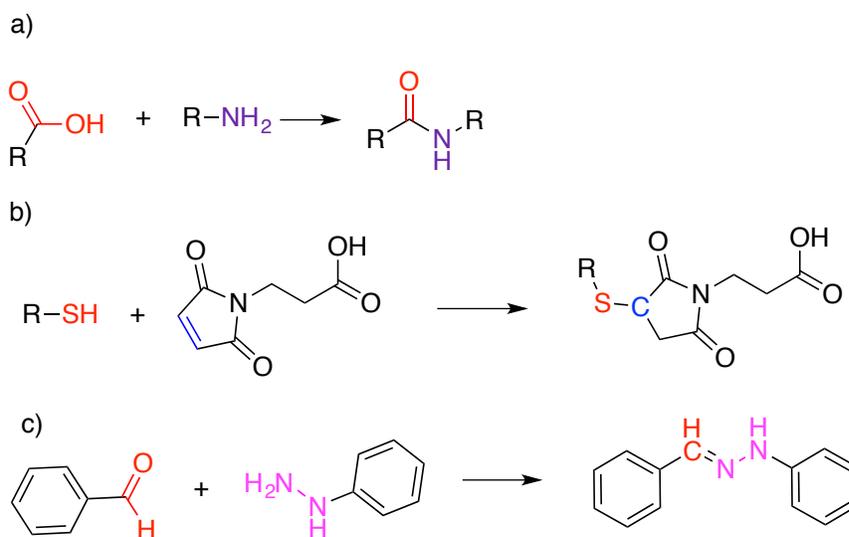


Figura 11. Esquema de funcionalidades químicas utilizadas en acoplamiento covalentes para la formación de (a) amidas, (b) tioéteres e (c) hidrazonas.

Las modificaciones químicas o la creación de bioconjugados con grupos funcionales reactivos o selectivamente reactivos, son la base para el entrelazamiento, para el marcado

de moléculas diana. En este sentido, y en referencia a los principales grupos funcionales que presenta el MTX, la molécula presenta grupos amino y carboxilatos libres disponibles, a partir de los cuales, resulta viable generar estrategias de acoplamiento covalente con una macromolécula portadora, como una proteína.⁴⁷

La funcionalidad del carboxilato presenta una nucleofilicidad baja en disolución acuosa, por tal motivo, los grupos químicos que reaccionan de forma específica con ácidos carboxílicos son limitados, y la gran mayoría de los reactivos se unen a través de un proceso de adición nucleofílica. Entre los reactivos más utilizados para la activación de grupos carboxilatos podemos encontrar diazoalcanos, diazoacetatos, *N,N'*-carbonil diimidazol y las carbodiimidas (**Figura 12**).

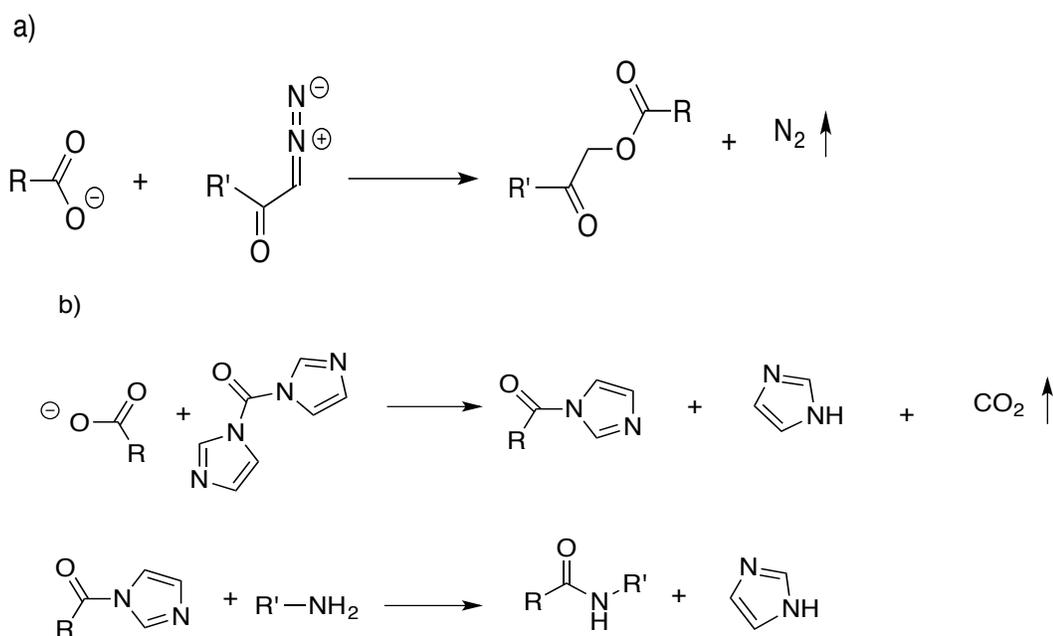


Figura 12. Activación del grupo carboxilato mediada por (a) diazoacetatos y (b) *N,N'*-carbonil diimidazol.

Las carbodiimidas son agentes de entrelazamiento que activan el grupo carboxilato, para su acoplamiento con compuestos que contenga un grupo amino, la reacción de este tipo de carbodiimidas procede por la formación de una *O*-acilisourea que es altamente reactiva y con un tiempo de vida media corto en medio acuoso, generando que el grupo carboxilato sufra un ataque nucleofílico de una amina, dando como resultado la formación de una amida (**Figura 13**).⁴⁸

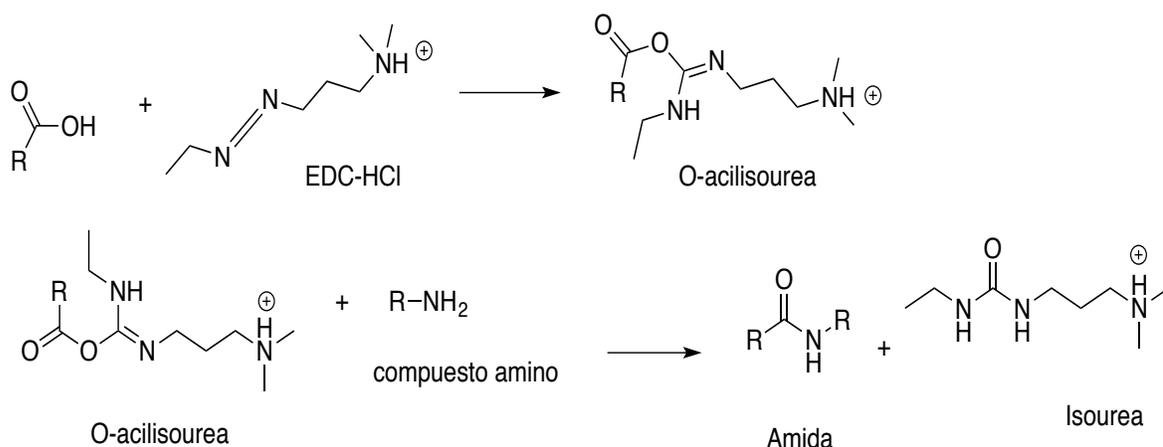


Figura 13. Activación del grupo carboxilato utilizando una carbodiimida.

Otra estrategia utilizada para la activación de esta funcionalidad, se basa en la activación del grupo hidroxilo mediante la utilización de carbonato de *N,N'*-disuccimidilo (DSC) o cloroformiato de *N*-hidroxisuccimidilo (CDI), estos compuestos son utilizados cuando se busca la conjugación de moléculas que contengan un grupo amino (**Figura 14**).⁴⁹

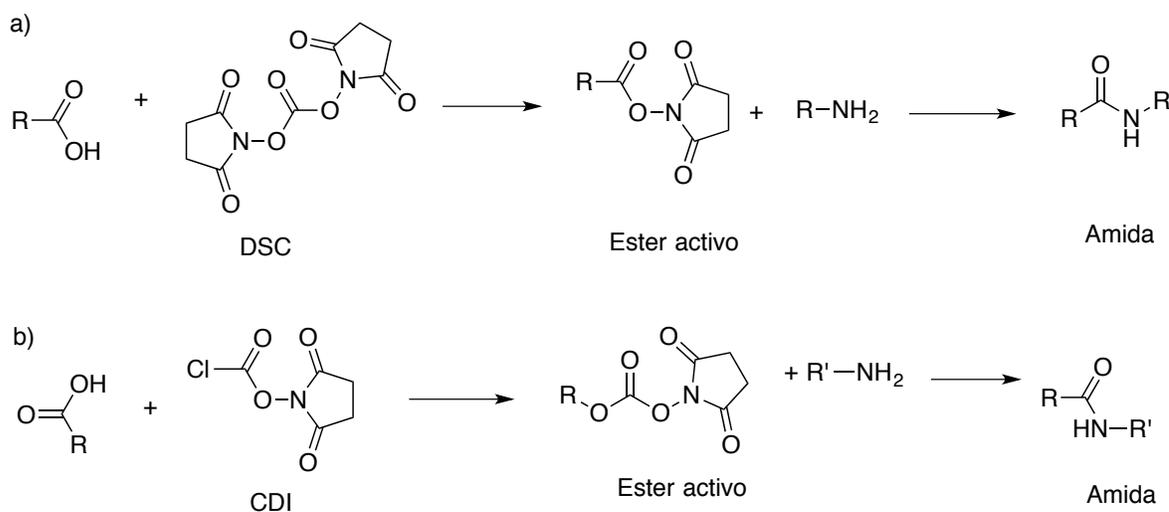


Figura 14. Activación mediada por (a) DSC y (b) Cloroformiato de NHS.

Otro elemento importante para la elaboración de bioconjugados, es la macromolécula a la cual se acoplará covalentemente el análogo estructural o el analito mismo. Entre este tipo de moléculas, las proteínas resultan importantes con vista a que

tales bioconjugados se empleen como inmunorreactivos para el desarrollo de un inmunoensayo. Entre las proteínas utilizadas para la síntesis de bioconjugados, se pueden encontrar a la hemocianina de lapa californiana, tiroglobulina, proteínas toxoides, mioglobina, albumina de suero de conejo, moléculas de inmunoglobulina, polipéptidos sintéticos, *peroxidasa de rábano picante (HRP)*, *ovoalbúmina (OVA)* y *albumina de suero bovino (BSA)*.⁴⁶

La proteína BSA es muy soluble además de contar con numerosos grupos funcionales que facilitan su conjugación. Entre los grupos funcionales de relevancia química se encuentran grupos carboxílicos, 17 grupos imidazol de la histidina, 19 residuos de fenolato de la tirosina, un sulfhidrilo de la cisteína, 59 residuos de lisina con grupos amino de los cuales, 30-35 están disponibles para su derivatización.^{46,49}

Adicionalmente, la elección preferente de BSA como macromolécula en la obtención de un bioconjugado, obedece a su carácter inmunogénico que favorece el reconocimiento de las células presentadoras de antígeno. Los bioconjugados de BSA acoplados a compuestos de peso molecular pequeño son utilizados en la etapa de inmunización, debido a que se promueve la generación de una respuesta inmunológica rápida.

Un factor relevante en el desarrollo de conjugados es seleccionar aquellas proteínas que no presenten semejanza alguna con la proteína acarreadora, ello con la finalidad de evitar reacciones cruzadas de los anticuerpos. Es decir, la naturaleza proteica del conjugado inmunizante, deberá buscarse que sea diferente para aquellos bioconjugados cuya finalidad sea emplearse como inmunorreactivos en el desarrollo de un inmunoensayo. Algunas de las proteínas que se pueden utilizar en la síntesis de conjugados de ensayo son la tiroglobulina, proteínas toxoides y la ovoalbúmina (OVA).

La OVA es una proteína que con éxito se ha empleado como operador no relevante para la BSA; cabe mencionar que la BSA y la OVA poseen algunos epítomos inmunológicamente similares, de manera que, se puede suscitar un reconocimiento inmunológico por los anticuerpos generados por la BSA-hapteno.⁴⁶

La proteína OVA contiene un sitio de *N*-glicosilación y 386 aminoácidos, 14 ácidos aspárticos, 33 ácidos glutámicos, 20 residuos de lisina, con un total de 47 carboxilatos con

un C-terminal y 20 aminas con N-terminal ideales para reacciones de conjugación. Por tanto, los conjugados de OVA se han utilizado ampliamente como inmunorreactivos para el tapizado de microplacas ELISA en inmunoensayos de formato indirecto.^{46,50}

Otra área de aplicación de los bioconjugados es la detección y seguimiento de biomoléculas para la cuantificación y desarrollo de inmunoensayos. Los modelos conjugados para la detección, pueden consistir en componentes trazables, etiquetas fluorescentes, radiomarcadores, agentes de contraste, nanopartículas, soportes sintéticos como dendrímeros de fulerenos, proteínas fluorescentes, reactivos intermediarios de biotina-estreptavidina y enzimas. Las enzimas más utilizadas para la generación de conjugados que proporcionen señales en los inmunoensayo son la fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y la peroxidasa de rábano picante (HRP).⁵¹

Una de las enzimas popularmente empleada en la preparación de bioconjugados anticuerpo-enzima y hapteno-enzima es la HRP; glicoproteína que contiene cantidades significativas de carbohidratos, sus cadenas de polisacáridos suelen usarse en reacciones de acoplamiento a moléculas diana. La enzima posee solo dos grupos aminos libres que pueden ser utilizados en la formación de bioconjugados, a través de aminación reductiva a los grupos amino en las inmunoglobulinas; esta enzima esta acoplada aproximadamente al 80% de los conjugados de anticuerpos que se utilizan en sistemas de inmunoensayos. Algunas de las ventajas de la enzima HRP, además de su naturaleza robusta y estable, es la formación de productos fluorescentes y quimioluminiscentes que se encuentran entre los reactivos de detección más sensibles, razón que facilita la detección de pequeñas cantidades de analitos específicos.^{46,51}

En el rubro de generar productos de señalización que permitan realizar una medición del analito, se encuentra el complejo Biotina-estreptavidina. La constante de disociación de este complejo ($K_d = 4 \times 10^{-14}$ M) demuestra que es una interacción no covalente fuerte.⁵² Este potencial de enlace se conserva en condiciones excesivas de pH, solventes orgánicos, agentes desnaturalizantes, temperatura, peptidasas y detergentes (**Figura 15**).^{46,53}

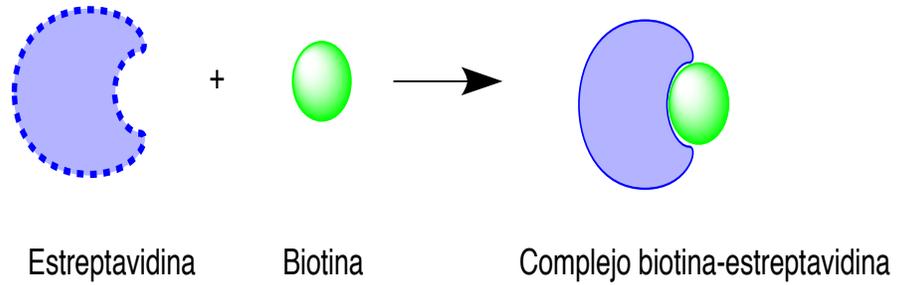


Figura 15. Formación de complejo biotina-estreptavidina.

La interacción altamente específica de la estreptavidina con la biotina es una herramienta utilizada para la elaboración de dispositivos de ensayo, selección y determinación de analitos, todo esto se puede lograr si el complejo estreptavidina-biotina contiene componentes de detección; ello es posible gracias a la capacidad de la biotina de unirse covalentemente a otras moléculas diana, de manera que, puede ser utilizado para ensayos de hibridación de ADN, citometría de flujo e inmunoensayos.^{52,53}

2. Hipótesis

El acoplamiento covalente del MTX a proteínas como BSA, OVA y HRP, genera bioconjugados proteicos con cargas hapténicas aptas para utilizarse como inmunorreactivos para la eventual obtención de anticuerpos y desarrollo de inmunoensayos tipo ELISA para su identificación.

2.1 Objetivos

Este estudio, pretende obtener como principal producto de investigación bioconjugados proteicos del metotrexato, inmunorreactivos clave para la eventual producción de anticuerpos. Para este fin, será indispensable alcanzar un grupo de objetivos específicos que se enuncian a continuación:

1. Diseñar y sintetizar análogos estructurales funcionalizados (haptenos) del metotrexato.
2. Obtener los bioconjugados proteicos de seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina (OVA) y peroxidasa de rábano picante (HRP) de los haptenos correspondientes.
3. Purificar y caracterizar los bioconjugados proteicos correspondientes, en términos de cuantificar la carga hapténica.

Dentro del esquema de trabajo planteado, adicionalmente se pretende cubrir las siguientes metas:

1. Explorar rutas de síntesis para la obtención de los haptenos propuestos al objeto de seleccionar aquella de mayor accesibilidad.
2. Obtener los ésteres activos, preferentemente de *N*-hidroxisuccinimidilo, de los haptenos funcionalizados al objeto de realizar el acoplamiento covalente con los grupos amino de los residuos de *L*-lisina de la proteína correspondiente.
3. Purificar por exclusión molecular los bioconjugados proteicos generados
4. Liofilizar alícuotas de los bioconjugados proteicos para efecto de estimar la carga hapténica de los mismos.
5. Determinar la viabilidad de los bioconjugados proteicos.

3. Materiales y métodos

3.1 Síntesis de haptenos del metotrexato

Los reactivos usados para la obtención del éster activo fueron metotrexato estándar de referencia, trietilamina y carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC) todos ellos marca Sigma Aldrich, disponibles comercialmente sin procesamiento preliminar exceptuado aquellos que así lo requieran. Los procedimientos con compuestos susceptibles al aire y/o humedad se llevaron a cabo bajo ambiente inerte de N₂ deshumedecido o argón, utilizando cánulas o jeringas, material de vidrio desecado en estufa a 110 °C y solventes recién destilados y desecados. La destilación y secado de los solventes orgánicos previo a su uso se dio conforme a los procedimientos comunes. También se destiló etanol, tolueno y tetrahidrofurano en benzofenona y sodio en ambiente inerte previo a su uso; en el caso de diclorometano y acetonitrilo se destilaron en hidruro de calcio bajo atmósfera de N₂. El Metano se almacenó en tamiz molecular de 3 Å después del desecado. Se destiló DMF en hidruro cálcico y se envasó a -20 °C en tamiz molecular de 4 Å.

La determinación de los puntos de fusión se llevó a cabo en un instrumento Büchi Punto de Fusión M-560 los datos se aportaron sin corrección. La técnica utilizada para la obtención de los espectros de *infrarrojo (IR)* fue *reflectancia total atenuada (ATR)* mediante espectrómetro Nicolet Avatar Mod. 320 FT-IR que no requiere de preparación previa de las muestras. La intensidad de los picos se definió como fuerte (f), media (m) o débil (d). En el caso de *resonancia magnética nuclear (RMN)* los espectros se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance DRX-300MHz y/o DRX-500MHz a 300.13 y 500 MHz respectivamente, para RMN ¹H, 282.38 MHz para RMN ¹⁹F y 75.48 MHz para RMN ¹³C; Para cada uno de los productos se utilizó el disolvente deuterado adecuado.

Para la referencia de los desplazamientos químicos en ppm se utilizó el disolvente deuterado correspondiente a cada caso, además, los desplazamientos químicos (δ) de ¹H y ¹³C se expresaron en referencia a tetrametilsilano (TMS). Los pulso 135° DEPT se utilizaron para determinar el grado de sustitución de los carbonos, asimismo, los experimentos 2D RMN, COSY y HSQC se utilizaron como apoyo para la asignación de señales de ¹H y ¹³C; algunas señales con supra índices semejantes pueden encontrarse intercambiadas. Los

patrones de desdoblamiento espectral, se designaron como: *s* (*singlete*), *d* (*doblete*), *dd* (*doble doblado*), *ddd* (*doble doblado doblado*), *t* (*triplete*), *dt* (*doble triplete*), *c* (*cuartete*), *quint* (*quintuplete*), *m* (*multiplote*).

Los datos generados en los *espectros de masas de alta resolución (EMAR)* están expresados como relación masa/carga (*m/z*), los datos se obtuvieron a través de un espectrómetro de masas *Q-TOF premier* equipado con una fuente de *electrospray (Waters, Manchester, UK)*.

El seguimiento de las reacciones se llevó empleando cromatografía en capa fina (CCF), se utilizaron placas de sílice Merck 60 F254 de 0.25 mm con indicador fluorescente. Los productos se observaron con radiación ultravioleta de 254 nm, además, se emplearon reveladores químicos, tales como: vapores de yodo, molibdato sérico amónico acuoso, ácido fosfomolibdico etanólico y ninhidrina. De manera apropiada, después de empapar las placas en la solución reveladora se calentó con una secadora hasta la obtención de la coloración deseada.

La cromatografía flash se utilizó en la purificación de los productos sintetizados en columna de sílice Merck 60 (230-400 mesh), utilizando como eluyente la mezcla de solventes adecuada para cada producto.

3.1.1 Síntesis del éster activo de metotrexato

Se preparó en un matraz de reacción una solución conteniendo 25 mg (0.055 mmol) de metotrexato, 10 mg (0.0715 mmol) de carbonado de *N,N'*-disuccinimidilo y 29.13 μ L de trietilamina (ET_3N) en 1 mL de dimetilformamida (DMF)(**Figura 16**). La reacción se montó en atmosfera inerte con N_2 durante 16 horas en condiciones estándar y agitación suave. Finalizado el tiempo la mezcla de reacción se utilizó directamente para la síntesis de los bioconjugado proteicos. Para procesar la reacción se lavó la mezcla de reacción con NH_4Cl y se llevó a cabo una extracción líquido-líquido, despues de esto se lavó nuevamente con salmuera y se realizó la una extracción más, la fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro para eliminar los residuos de humedad; la fase orgánica se filtró y se retiró el solvente empleando rotavapor. La purificación del residuo se realizó empleando cromatografía en columna utilizando como eluente una mezcla de diclorometano-metanol 7:3.

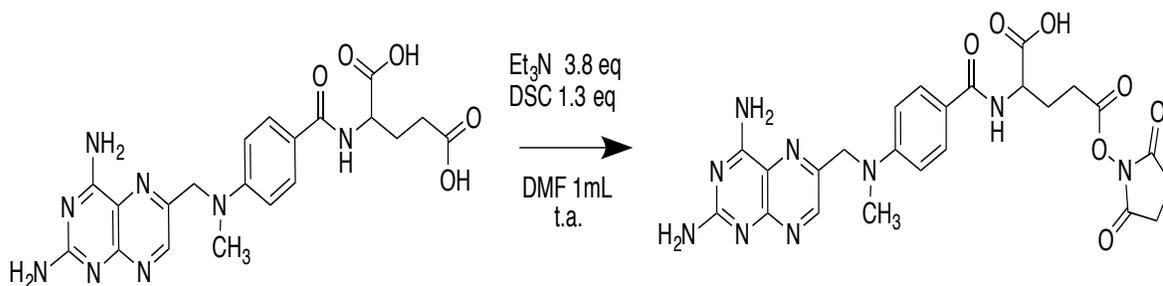


Figura 16. Formación del éster activo de NHS-MTX

3.1.2 Preparación de bioconjugados proteicos

La adquisición de la *ovoalbúmina (OVA, Grado V)* y la *peroxidasa de rábano picante* se dio por medio de (*HRP, Tipo VI-A; actividad específica ≈ 250-330 unidades/mg empleando pirogalol como substrato*) de Sigma-Aldrich. Roche Applied Science suministró la *seroalbúmina bovina (BSA, Fracción V)*. A partir del éster activo sintetizado, se prepararon los conjugados correspondientes de inmunización empleando la proteína BSA (seroalbúmina bovina), y los bioconjugados de ensayo *OVA-hapteno* y *HRP-hapteno* (Ovoalbúmina y Peroxidasa de rábano picante, respectivamente) aplicando para ello, protocolos de conjugación descritos en la literatura y que brevemente se describen a continuación. La cromatografía de exclusión molecular se utilizó para la purificación de los conjugados proteína-hapteno y se realizó utilizando columnas *Sephadex G-25 HiTrap Desalting*, proporcionadas por *General Electric Healthcare*. Como eluyente se empleó tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Los espectros UV-Vis de los bioconjugados se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda-XLS.

3.1.2.1 Preparación de los conjugados inmunogénicos con BSA

Para la preparación se mezcló 73.5 μL de una disolución que contenía 3.91 μmoles del éster activo de metotrexato en DMF anhidra con 1.8 mL de una solución de BSA (15 mg/mL), se añadieron lentamente en agitación continua, en buffer de carbonato 50 mM, pH 9.6. La mezcla de reacción se dejó durante 2 h a temperatura ambiente y agitación. Una vez que expiró el tiempo, los conjugados se separaron por cromatografía de exclusión molecular utilizando 3 columnas acopladas *HiTrap Desalting Columns* de 5 mL, usando como buffer de

elución fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Por último, después del proceso de purificación, las fracciones recolectadas que tenían los conjugados de BSA se esterilizaron por filtración empleando cartuchos estériles de nylon acrodisc 0.45 micras, a la postre, las fracciones esterilizadas se diluyeron a una concentración final de 1 mg/mL con buffer de elución y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se tomó una alícuota de 100 μL del bioconjugado BSA-hapteno purificado, el cual se dializó y liofilizó, se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF el número de moléculas de hapteno incorporadas por molécula de proteína.⁴⁶

3.1.2.2 Preparación de los conjugados de tapizado con OVA

Para la formulación del conjugado se midieron 74 μL que contenían 8.58 μmoles del hapteno activado y se mezclaron lentamente con una alícuota de 1.9 mL de una solución de OVA (9 mg/mL) disuelta en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. Al expirar las 2 h de reacción a temperatura ambiente y agitación continua, se realizó la purificación de los conjugados con el procedimiento descrito con anterioridad para los conjugados de BSA. Las fracciones colectadas se diluyeron a una concentración final de 1 mg/mL en buffer de elución con timerosal al 0.01% (v/v) y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se preparó una volumen del conjugado recientemente obtenido del proceso de diálisis y se liofilizó para determinar la eficiencia de la conjugación, en principio del número de haptenos asociados al conjugado, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.⁵⁴

3.1.2.3 Preparación de trazadores enzimáticos con HRP

Respecto a la preparación de este conjugado se partió de una solución que contenían 176 μmoles en DMF del hapteno activado, se tomaron 57 μL y se adicionaron ininterrumpida sobre 0.9 mL de una solución de HRP (2.2 mg/mL) en solución amortiguadora de carbonato 50 mM, pH 7.4. La reacción se dejó avanzar por 2 h a condiciones estándar. Después de concluido el tiempo de reacción, los trazadores enzimáticos se purificaron reproduciendo la técnica descrita anteriormente para los otros bioconjugados, se preparó un volumen de los mismos para la determinación de la carga hapténica respecto a la enzima previo procedimiento de diálisis y liofilización. Los

trazadores se diluyeron a cantidades conocidas en timerosal al 0.02% (p/v) y buffer de PBS con BSA al 1% (p/v), y se guardaron a 4 °C.⁵⁵

3.2 Análisis de conjugados proteicos por MALDI-TOF-MS

La espectrometría de masas se utilizó para la determinación de la carga hapténica en equipo *5800 MALDI TOF-TOF (ABSciex)* en modalidad linear positivo (*1500 disparos para cada posición*) en un intermedio de masas de 10000-120000 m/z. Los liofilizados se acondicionaron en 100 µL de una solución acuosa la cual contenía 0.1% de TFA y un 2% de MeCN y; la concentración teórica final fue 1 µg/µL. Asimismo, 0.5 µL de la solución se transfirieron al plato de MALDI y después del secado de la alícuota a temperatura ambiente, para finalizar se agregó 0.75 µL de matriz ("*5 mg/mL, estándar analítico Bruker*") en 0.1% TFA-CH₃CN/H₂O (7:3, v/v) y se dejó desecar a temperatura ambiente. Con la finalidad de disminuir el error en la atribución de la masa tanto de la proteína estándar como del bioconjugado proteína-MTX, se usó el programa *mMass-Open Source Mass Spectrometry Tool versión 5.5*. La Variación de masa entre los espectros de la proteína estándar y la proteína modificada, fraccionada por la masa incrementada por cada molécula de hapteno, señaló la media de unión del hapteno correspondiente.⁵⁶

3.3 Producción de anticuerpos policlonales

3.3.1 Inmunización de conejos

Para este paso se emplearon dos conejos hembras *New Zealand* con un peso cercano a 2 kg. Se inyectaron ambos conejos con el inmunógeno BSA-MTX con el siguiente esquema de inmunización:

En la 1ª inmunización, se administro por inoculación subcutánea 300 µg de inmunógeno a cada conejo generando una emulsión 1:1 (v/v), con adyuvante de Freund completo y llevándolo a un volumen total de 1 mL, repartiéndose la dosis en la región dorsal del animal. A espacios de tres semanas, adicionalmente los conejos percibieron tres inmunizaciones con la misma porción de inmunógeno, la emulsión en estos casos se preparó con adyuvante de Freund incompleto con relación del conjugados 1:1. A continuación, pasados diez días de la 3ª inmunización, como punto de control se obtuvo una muestra de sangre de los conejos por sangrado parcial de la vena auricular de la oreja.

3.3.2 Obtención de antisueros de conejo

Pasados diez días de la cuarta inmunización, los conejos se exanguinaron por punción intracardiaca. Las muestras de sanguíneas obtenidas se conservaron a 4 °C por un espacio de 24 horas para promover la coagulación cuidando de no agitar los tubos y/o manipular demasiado para no hemolizar y, además cuando se colocaron en la nevera se cuidó que el tubo estuviese horizontal para facilitar y recuperar el mayor volumen de suero. Posteriormente, el suero que contenía los anticuerpos se separó del coágulo centrifugando en dos ocasiones a 2800 revoluciones durante 15 minutos. Se tomó un volumen del antisuero obtenido se diluyó 1:4 con PBS–timerosal 0.01% (p/v) y se guardó a 4 °C en frascos ámbar para su empleo diario. El remanente del antisuero se purificó fraccionadamente aplicando una doble precipitación con (NH₄)₂SO₄ saturado [1:1, (v/v)] y se almaceno a 4 °C para su mantenimiento a largo tiempo.

Tabla 4. Esquema de inmunizaciones.

Calendario	1a	2a	3a	Sangrado parcial	4a	Exsanguineo
10-Diciembre-18	X					
31-Diciembre-18		X				
21-Enero-19			X			
31-Enero-19				X		
11-Febrero-19					X	
21- Febrero-19						X

3.4 Análisis mediante ELISA

Las placas *Nunc MicroWell* de poliestireno *high-binding* fueron proporcionadas por *Thermo Scientific*. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-conejo marcado con HRP (*MAR-HRP*) se suministró de SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY (MOUSE ANTI-RABBIT IgG sc-2357). El *Tween 20* y la *o-fenilendiamina (OPD)* se adquirieron de *Sigma-Aldrich*. Las absorbancias de inmunoensayo se obtuvieron de un lector *MULTISKAN FC (Thermo Scientific)*. Las disoluciones de trabajo empleadas en las diferentes fases de los inmunoensayos comprendieron:

- **Tampón de tapizado:** tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM, pH 9.6.

- **PBS:** tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, 140 mM NaCl.
- **PBST:** PBS, Tween 20 0.05 % (v/v)
- **Disolución de parada de la reacción enzimática:** H₂SO₄ 1 M.
- **Disolución de lavado:** NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05% (v/v).
- **Disolución de revelado:** tampón de revelado (25 mM citrato sódico y 62 mM fosfato sódico, pH 5.4) con 2 mg/mL de OPD y H₂O₂ 0.012% (v/v).

3.4.1 Inmunoensayos para la detección de metotrexato

3.4.1.1 ELISA competitivo de conjugado inmovilizado (formato indirecto)

Los 96 pocillos de las placas se tapizaron con 100 µL del conjugado OVA-MTX correspondiente en buffer carbonato-bicarbonato, se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Las concentraciones del conjugado del tapizado se muestran de forma precisa en cada uno de los apartados de los capítulos de resultados, discusión y al final en la sección de anexos se localizan los protocolos para cada uno de los inmunoensayos desarrollados, habitualmente las concentraciones que se manejan son del orden de 1.0 o 0.1 µg/mL. La mañana siguiente, se lavaron las placas en cuatro ocasiones con solución de lavado, a continuación, se adicionó 50 µL por pocillo de una solución de MTX diluida de forma seriada en PBS (*curva patrón*), más 50 µL por pocillo de una solución de anticuerpo primario (*pAb*) en PBST. Luego de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron como se había mencionado previamente. Posteriormente, se agregaron 100 µL por pocillo una dilución 1:10,000 en PBST del anticuerpo secundario "*mouse anti-rabbit*" marcado con HRP, las placas se incubaron 1 h a temperatura ambiente, después se lavaron de nueva cuenta. La señal se generó por la adición de 100 µL por pocillo de solución de revelado, preparada instantes previos de su uso. La reacción enzimática se frenó a los 10 minutos después que se agregó 100 µL por pocillo de ácido sulfúrico 1 M.

3.4.1.2 ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado (formato directo)

Los anticuerpo (*pAb*) en este formato se inmovilizaron directamente en los pocillos de las placas empleando 100 µL por pocillo de una solución que contiene 1 µg/mL de *pAb* en buffer de carbonatos. Las placas se incubaron toda la noche a condiciones estándar, al día siguiente se lavaron. Después, se agregaron 50 µL por pocillo de la curva estándar de

MTX en PBS y 50 µL por pocillo de solución del conjugado enzimático de HRP en PBST. Transcurrido un periodo de incubación de 1 hora se lavaron las placas y se llevó a cabo la producción de la señal como se había mencionado en la sección pasada para el formato indirecto.

3.4.1.3 Procesamiento de la señal y curvas de inhibición

La obtención de la señal en el ensayo se dio espectrofotométricamente de forma dual a 450 nm y utilizando como referencia la longitud de onda de 620 nm. La representación de los valores de absorbancia generados en los inmunoensayos se exhibieron frente al logaritmo de la cantidad de MTX gráficamente en forma de curvas de inhibición, se ajustaron matemáticamente las curvas a la **ecuación 1** sigmoide de cuatro parámetros mediante el uso del software SigmaPlot 12.3.⁵⁷

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D \quad \text{Ecuación 1.}$$

Para la ecuación antes mencionada **y** es el valor de absorbancia conseguido frente a una cantidad **x** de analito; el parámetro **A** es la asíntota máxima [absorbancia medida en carencia de analito (A_{max})]; en el caso del parámetro **B** es la pendiente en el punto de inflexión de la curva; para **C** es la cantidad de analito en el punto de inflexión; y **D** es el valor de la asíntota mínima [**el ruido de fondo (A_{min})**] (**Figura 17**). El parámetro **C**, igualmente nombrado IC_{50} por coincidir con la cantidad de analito que genera una inhibición de la señal máxima del 50%, es el parámetro primordial de la curva, puesto que tiende a empelarse como valorante de la afinidad del anticuerpo por el analito o de la sensibilidad del inmunoensayo, en este contexto entre menor sea el valor de IC_{50} mayor sensibilidad tendrá en ensayo.

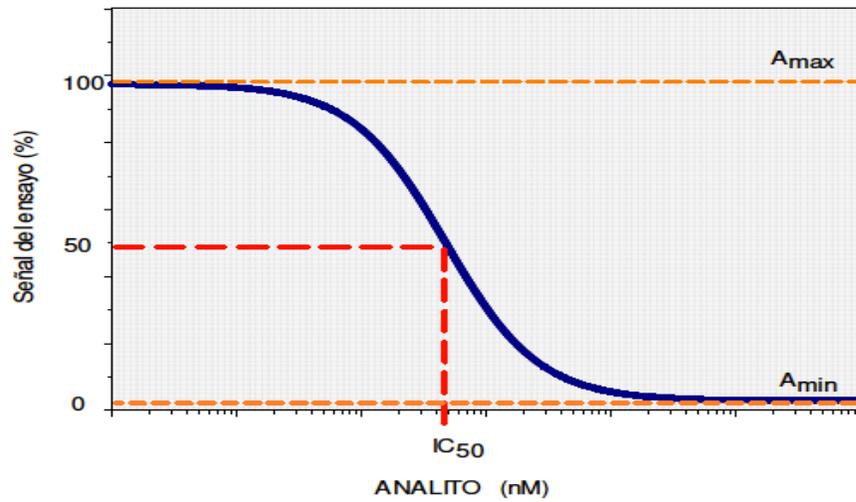


Figura 17. Curva de inhibición característica donde señalan algunos parámetros

Como complemento, en aquellas incidencias en las que se consideró necesario, los datos de absorbancia para cada curva específica se normalizaron con respecto al dato de la absorbancia experimental conseguida en carencia de analito (A_0), para favorecer la confrontación de diversos ensayos. Los datos de la absorbancia normalizada se tasaron con la ecuación 2 y los datos se presentaron en términos de dato absoluto a la unidad.

$$A_{\text{norm}} = A_{\text{experimental}} / A_0 \quad \text{Ecuación 2.}$$

4. Resultados y discusión

4.1. Diseño de los haptenos

Para la generación de anticuerpos de alta selectividad y afinidad para determinado analito, hasta el punto de la especificidad y la sensibilidad de las técnicas inmunoanalíticas que se desarrollen en base a los anticuerpos obtenidos, están condicionados por el hapteno funcionalizado que se use en el elaboración del conjugado inmunogénico.⁵⁸ La correlación electrónica y estructural que se da entre la molécula de referencia y el hapteno funcionalizado, y la disposición en que el esqueleto de éste se presenta al sistema inmunológico, limita la naturaleza del lugar de acoplamiento que se producirá del anticuerpo generado. Es por esto, que la fase de proyectar y sintetizar los haptenos se considera esencial para el proceso de generación del ensayo para analitos que cuentan con un peso molecular diminuto. Se considera que el hapteno diseñado debe conservar, de ser posible, la mayoría de las propiedades fisicoquímicas de la molécula original, acrecentando la semejanza del ambiente estérico y, de la misma forma, de ser así en moléculas flexibles, la condición de libertad conformacional.⁵⁹

Por otra parte, incluso hoy en día existiendo poderosos programas computacionales de simulación molecular que posibilitan obtener con precisión las propiedades electrónicas y conformacionales de cualquier molécula, en el trabajo de laboratorio el diseño y desarrollo de un conjunto de isómeros estructurales (haptenos regioisoméricos) es la principal táctica empleada para la generación de anticuerpos de alta afinidad orientada a moléculas de diminuto tamaño. Esta técnica consiste en integrar un brazo espaciador, que es una cadena alquil carbonada de bajo perfil inmunogénico, que se une al analito en diferentes posiciones, manteniendo al máximo su estructura y grupos funcionales, de tal forma que abarque la mayoría de los esqueletos complementarios de la molécula que se pueden presentar al sistema inmune.⁵⁹

Para cumplir con el objetivo de diseño los haptenos del MTX se tomaron en cuenta diversas características. El MTX es una molécula altamente polar que incorpora en su estructura tanto grupos carboxílicos como amínicos, cuya disociación y por tanto su solubilidad, en determinado disolvente, dependerá del pH de la disolución; por otro lado,

la accesibilidad química para las funcionalidades mencionadas se han limitado solo a los grupos carboxílicos, mientras que el acoplamiento de brazos espaciadores a través de los grupos amino disponibles en el anillo pteridínico esta escasamente documentado y el acoplamiento de cadenas alquil carbonílicas sea realizado por aproximaciones sintéticas de la misma molécula del MTX. Estas características estructurales y reactivas del MTX pueden encontrarse vinculada con que, actualmente, y a pesar de su cuantioso atractivo clínico no se cuentan con anticuerpos de elevada especificidad y selectividad para éste analito que permita el desarrollo de una plataforma inmunoanalítica competitiva con métodos instrumentales.

Con respecto a estos argumentos, a priori a la proyección de los haptenos a sintetizar, se llevó a cabo una serie de pruebas de solubilidad del MTX en diferentes disolventes tanto orgánicos como acuosos para una determinada concentración del fármaco (**Tabla 5**).

Tabla 5. Solubilidad del metotrexato.

Disolvente	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	Éter etílico	Buffer pH 7.4	MeCN	DMSO	DMF
Factor							
t.a.	Insoluble	insoluble	insoluble	Soluble	insoluble	Soluble	Soluble
pH alcalino (Et ₃ N) t.a.	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble

Como se observa en la tabla, se encontró que el MTX presenta solubilidad muy baja, aun en disolventes polares tanto orgánicos como inorgánicos cuando el pH de la disolución se encuentra por debajo de 7.4. Con base a estos resultados, se consideró que el montaje de las reacciones de activación de los grupos carboxilatos del MTX debería de realizarse en disolventes orgánicos polares a pH alcalino.

Para el diseño de los haptenos, se respetó la integridad del esqueleto y los grupos funcionales de la molécula, permitiendo plantear tres aproximaciones sintéticas para la obtención de tres análogos funcionalizados de MTX, mtx-C, mtx-N y mtx-pG, respectivamente.

El hapteno mtx-C, se refiere a la misma molécula del MTX sin modificación estructural que se acoplo covalentemente a través de los carboxilatos disponibles a la proteína correspondiente. El hapteno mtx-N es un análogo estructural funcionalizado del MTX en el que se pretendió incorporar un brazo espaciador por los grupos amino libres del anillo pteridínico. Finalmente, el hapteno mtx-pG contó con un brazo espaciador derivado de una unidad de glutamina, anclada covalentemente por la porción carboxílica de la molécula, a manera de generar un homólogo estructural del metotrexato poliglutamado (**Figura 18**).

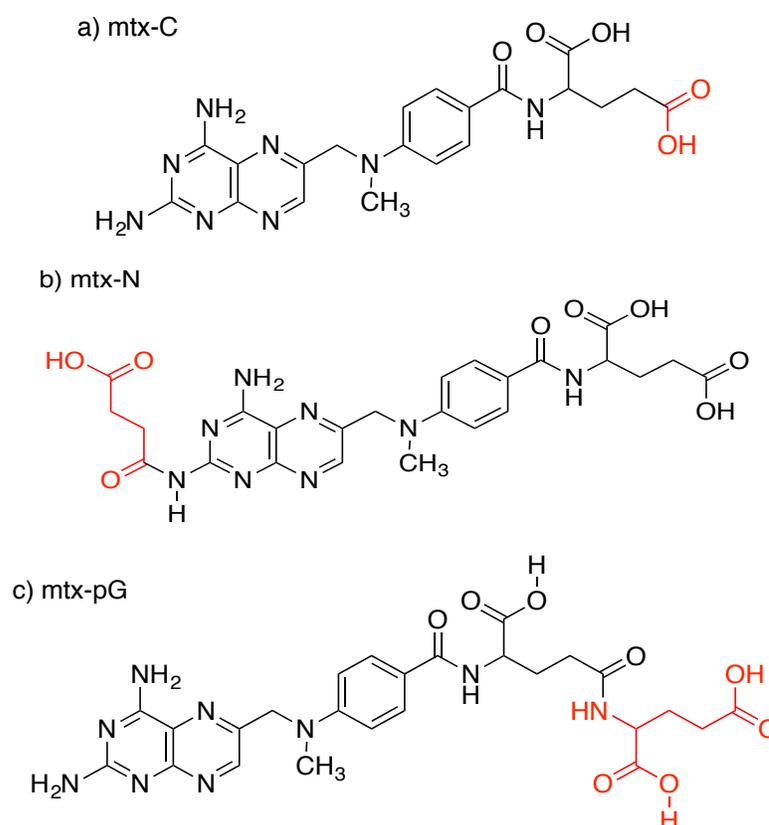


Figura 18. Estructuras de los haptenos a) mtx-C, b) mtx-N y c) mtx-pG indicando el punto de anclado del brazo espaciador.

La semejanza estructural de los haptenos con el MTX es evidente, dado que en todos los casos, el brazo espaciador se encuentra en ubicaciones que no expone considerablemente la libertad conformacional de la estructura que tiene con el MTX.⁶⁰ El

brazo espaciador está formado por una cadena de hidrocarburos que no aporta elementos inmunogénicos como pudieran ser insaturaciones, anillos aromáticos, etc., además su longitud es relativamente corta, se considera una longitud adecuada de cuatro átomos de carbono, para favorecer una apropiada separación del excedente proteico durante la exposición al sistema inmune del bioconjugado inmunogénico, sin generar un desmesurado reconocimiento de la propia cadena del brazo espaciador en correlación al MTX.

4.1.1 Síntesis de haptenos del MTX y preparación de bioconjugados

En las siguientes secciones se mencionan las alternativas de síntesis utilizadas para la formulación del hapteno mtx-C y sus correspondientes bioconjugados. En principio, mtx-C fue el mismo metotrexato a partir del cual se aprovecharon las funcionalidades presentes en la molécula. Para la estrategia de acoplamiento directo de este hapteno a las proteínas BSA, OVA y HRP, se realizó por activación del carboxilato disponible en la estructura del MTX a través de la formación de un éster activo de *N*-hidroxisuccinimidilo (**Figura 19**).

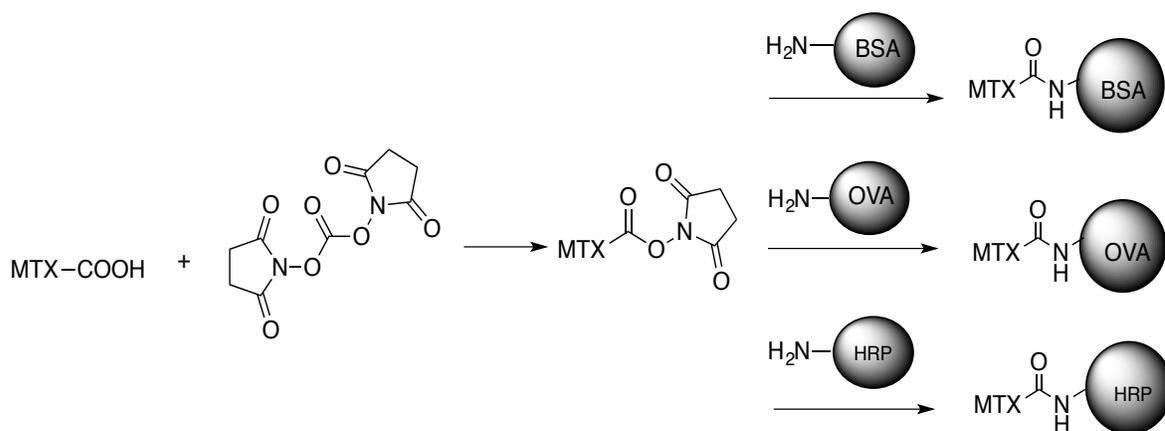


Figura 19. Esquema de obtención de los diferentes bioconjugados del hapteno mtx-C.

En nuestro caso, se exploraron diferentes estrategias de activación del carboxilato que condujeron a la formación del éster activo del mismo, encontrando mejores resultados cuando la reacción se montó utilizando 1.3 equivalentes de *DSC* y 3.8 equivalentes de *triethylamina* (*Et₃N*) en DMF anhidra y agitación suave bajo atmósfera inerte de nitrógeno durante 16 horas (**Figura 20**).⁶¹

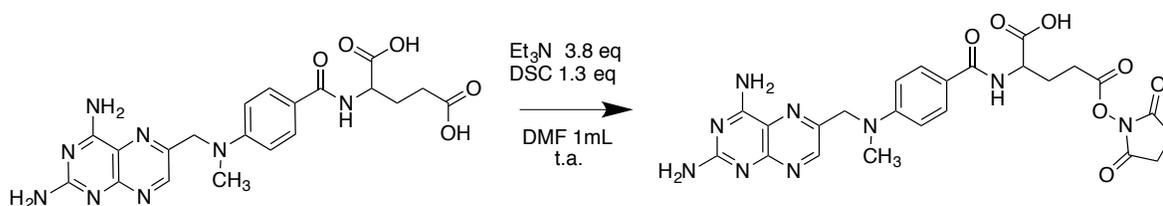


Figura 20. Formación del éster activo de NHS-MTX

Durante el proceso de activación del carboxilato, se presentaron problemas de purificación derivadas de la solubilidad del producto eventualmente generado y observado por CCF. Después de aplicar varias estrategias de solución que involucraron desde la modificación del pH de la mezcla de elución por adición de Et_3N , mezclas ternarias de elución, empleo de columna semipreparativa, entre otras; se decidió aislar el crudo sin previa purificación e identificar la formación del éster activo de *N*-succimidilo por RMN de ^1H , por la aparición clara de un singlete ancho hacia 2.84 ppm, que integra a cuatro protones, correspondientes a los protones de los metilenos del anillo de succimidilo.^{62,63}

4.1.2 Preparación del bioconjugado inmunizante de BSA

Una vez activado el hapteno mtx-C se procedió a acoplarlo covalentemente con la proteína BSA; así pues, a fin de generar el bioconjugado inmunizante BSA-mtx-C, se mezcló la BSA con el crudo de reacción de formación del éster activo de *N*-succimidilo con una relación molar inicial (RM_0)= 23 hapteno/proteína. Después de dos horas de reacción el producto se purificó por exclusión molecular y el grado de integración de los haptenos se obtuvo por UV/vis y se confirmó por MALDI-TOF-MS.⁴⁶

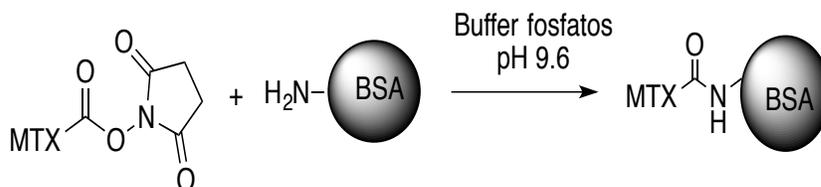


Figura 21. Síntesis del bioconjugado de mtx-C-BSA.

Con la finalidad de determinar la densidad hapténica del bioconjugado inmunizante, se recolectaron las fracciones que presentaron picos de absorción a 281 nm correspondiente al máximo de absorción de la BSA (**ver Figura 14**), después que se

esterilizaron las fracciones seleccionadas se diluyeron a una concentración de 1 mg/mL y se conservaron a -20 °C. A partir de la disolución anterior, una alícuota de 100 µL se liofilizó con el propósito de calcular la carga hapténica por espectrometría de masas MALDI/TOF.

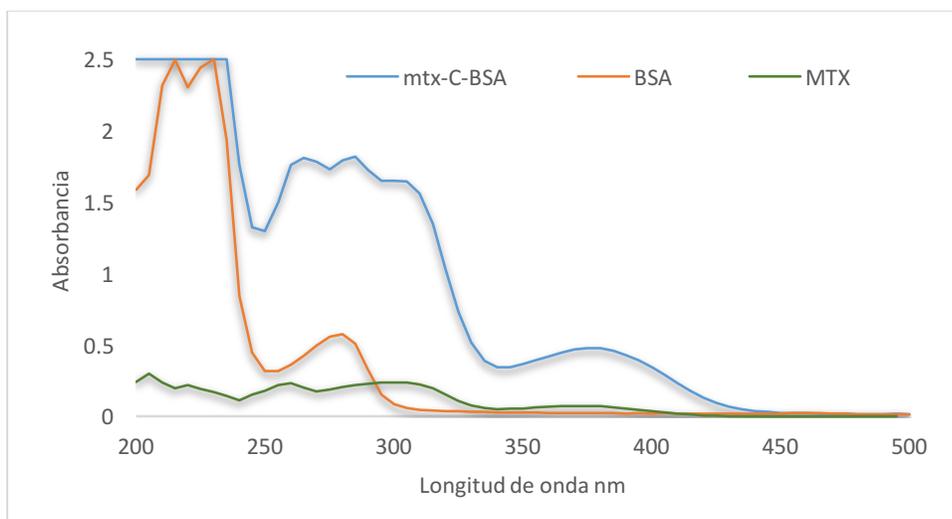


Figura 22. Espectros UV/vis del MTX (verde), la proteína BSA (naranja) y el bioconjugado mtx-C-BSA (azul).

Tal como se aprecia en la **figura 22** la modificación del espectro de absorción UV/vis de la BSA resultó evidente e indicativo de la incorporación en su estructura de moléculas de MTX. En este sentido y aprovechando los coeficientes de absorción molar (ϵ) mayores a $10,000 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ que presenta el MTX, se estimó el grado de incorporación de moléculas de MTX a la BSA aplicando el principio de absorbancias aditivas de la ley de Beer-Lambert; estrategia complementaria a la estimación por MS-MALDI/TOF y ampliamente utilizada para aquellos haptenos que presentan coeficientes de absorción molar altos.^{63,66,67}

Para la aplicación de este método y a propósito de calcular la ϵ del hapteno mtx-C, se preparó una solución stock 0.1 mM del hapteno en tampón de fosfatos 100 mM pH 7.4, en función de la cual se efectuaron diluciones seriadas 1:2 y se tomaron las lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda, 250, 260, 270, 280, 290 y 400 nm (**tabla 6**).

Tabla 6. Absorbancias del hapteno mtX-C

C_{Hapt} (mM)	Absorbancias a λ nm					
	250	260	270	280	290	400
0.003125	0.000	0.012	0.000	0.002	0.011	0.000
0.006250	0.087	0.118	0.084	0.084	0.064	0.000
0.012500	0.199	0.249	0.188	0.204	0.221	0.028
0.025000	0.402	0.386	0.522	0.402	0.522	0.088
0.050000	0.864	1.095	0.824	0.901	1.031	0.182
0.100000	1.511	1.899	1.437	1.576	1.831	0.336

A partir de los valores de absorbancia a diferentes longitudes onda del hapteno mtX-C, se calcularon los coeficientes de extinción molar que se muestran en la **tabla 7**. En ésta, se observa para este hapteno, una lectura de ϵ del orden de $50,000 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, valor indicativo de la viabilidad de estimar la densidad hapténica cuando mtX-C se encuentre incorporado a una proteína. Bajo éste mismo esquema, se obtuvieron los coeficientes de extinción molar de la proteína BSA a diferentes longitudes de onda y una concentración de 1 mg/ml (**tabla 8**).^{65,66}

Tabla 7. Coeficientes de extinción molar para el hapteno mtX-C

λ (nm)	$\epsilon \lambda^p$ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	R^2
250	$48.01460072 \pm 2.04630003$	0.99278713
260	$60.57964148 \pm 3.146467301$	0.989324413
270	$45.18711557 \pm 3.263781058$	0.979558942
280	$50.22576711 \pm 2.105138143$	0.993022065
290	$58.46885502 \pm 2.532843019$	0.9925496
400	$10.98282836 \pm 0.44164681$	0.993573393

Tabla 8. Coeficientes de extinción molar para la proteína BSA

λ (nm)	$\epsilon \lambda^p$ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
BSA	
250	20.13
260	21.95
270	32.38
280	35.82
290	14.5
400	-
M_r (g/mol)	66000

Con los valores de los coeficientes de extinción molar tanto del hapteno como de proteína, y aplicando, como se mencionó, el método de absorbancias aditivas, se estimó la carga hapténica del bioconjugado mtx-C. En este procedimiento, se considera la absorbancia total del conjugado se debe a la sumatoria de las absorbancias individuales de cada uno de los constituyentes presentes en la molécula, de tal manera que estos incrementos de absorbancia determinan la carga hapténica promedio del conjugado (**ecuación 3**).⁵⁰

$$C_P = \frac{A_{\lambda 1} \epsilon_{\lambda 2}^H - A_{\lambda 2} \epsilon_{\lambda 1}^H}{\epsilon_{\lambda 1}^P \epsilon_{\lambda 2}^H - \epsilon_{\lambda 1}^H \epsilon_{\lambda 2}^P}$$

$$A_{\lambda 1} = \epsilon_{\lambda 1}^P C_P + \epsilon_{\lambda 1}^H C_H \longrightarrow C_H = \frac{A_{\lambda 2} \epsilon_{\lambda 1}^H - A_{\lambda 1} \epsilon_{\lambda 2}^H}{\epsilon_{\lambda 1}^P \epsilon_{\lambda 2}^H - \epsilon_{\lambda 1}^H \epsilon_{\lambda 2}^P}$$

$$A_{\lambda 2} = \epsilon_{\lambda 2}^P C_P + \epsilon_{\lambda 2}^H C_H$$

Ecuación 3. Sistema de ecuaciones del método de absorbancias aditivas de la Ley de BEER.

Resultado del procedimiento anterior, en la **tabla 9** se exhiben los valores calculados de la carga del hapteno mtx-C a la proteína BSA vía espectroscopía UV-vis. En la tabla se observa que se encontró un valor de RM_f igual a 6.6 moléculas del hapteno mtx-C incorporadas a la estructura de la proteína BSA.

Tabla 9. Carga hapténica del conjugado mtx-C-BSA obtenida por UV-vis.

Longitud de onda	C(BSA)		C(MTX)	RM
	(mM)	(mg/mL)	(mM)	(n_H/n_P)
260	1.510×10^{-2}	1	0.0993143	6.57710596
280	1.510×10^{-2}	1	0.08428072	5.581504636

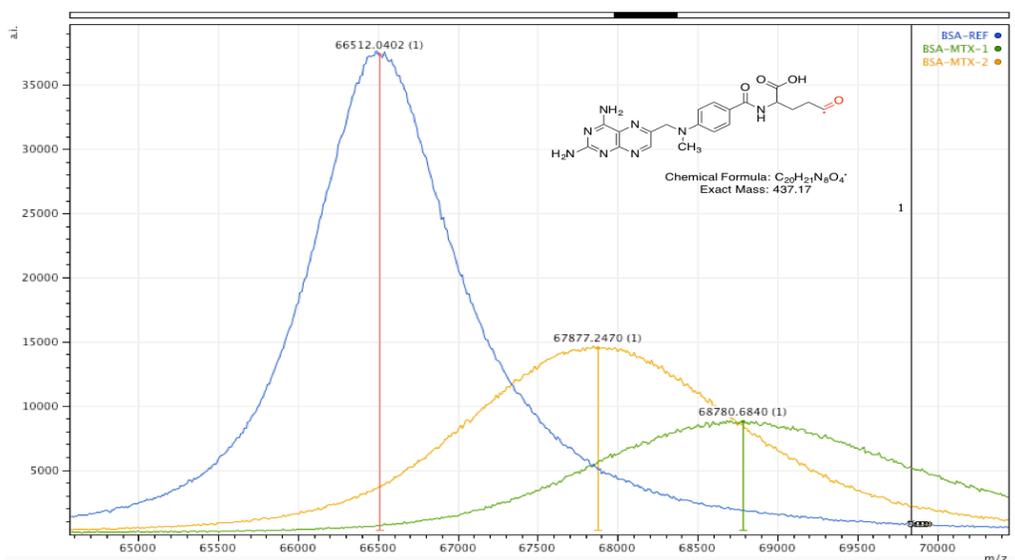
n_H número de moles del hapteno.

n_P número de moles de la proteína.

Con el objetivo de aumentar la carga hapténica de bioconjugado inmunizante se montó otro lote de reacción para la conjugación del hapteno mtx-C, aumentando la relación molar (RM_0)= 32 hapteno/proteína, obteniendo valores de carga hapténica menores a los que presentó la reacción de conjugación anterior.

Lateralmente, y a razón de confirmar la carga hapténica de los bioconjugado de BSA con el hapteno mtx-C estimada por espectroscopía UV-vis, una muestra liofilizada de los conjugado mtx-C-BSA se analizó por espectrometría de masas-MALDI/TOF.^{63,65}

En la **figura 23** se presentan los espectros de masas de la proteína BSA como la de dos bioconjugados mtx-C-BSA correspondientes a dos lotes diferentes de conjugación. En ésta se puede apreciar que, en ambos casos, la proteína BSA sufre modificaciones importantes en su masa debido al grado de conjugación hapteno-proteína. En los datos adjuntos de la misma figura se presentan los resultados de las relaciones molares hapteno-proteína (RM) calculadas a partir de las diferencias másicas de la razón espectrométrica m/z correspondiente a dos bioconjugados del hapteno mtx-C. En ellos se muestra que, se obtuvo una RM_f igual a 3.12 haptenos/proteína para el bioconjugado mtx-C-BSA lote 2 y una RM_f de 5.2 haptenos/proteína para el bioconjugado mtx-C-BSA lote 1. Con base a los valores presentados de carga hapténica, el bioconjugado seleccionado para realizar las inmunizaciones fue el conjugado mtx-C-BSA lote 1.



	m/z	$\Delta m/\text{hapteno}$	$\Delta(m/z)$	MR
BSA	66512.040	-	-	-
mtx-C-BSA	68789.684	437.17	2277.644	5.20
mtx-C-BSA-2	67877.247	437.17	1365.207	3.12

Figura 23. Espectros de masas de la proteína BSA y dos bioconjugados mtx-C-BSA.

Llegados a este punto, y con los datos de densidad hapténica en mano: 5.2 haptenos por unidad proteica, para el bioconjugado mtx-C-BSA (lote 1), nos resultó clara la baja densidad hapténica conseguida en el bioconjugado destinado a funcionar como inmunógeno en animales de experimentación. Aunque no resulta ser una regla general, de normal se estima que los conjugados de inmunización presenten una carga hapténica entre 15 a 17 haptenos por unidad proteica.⁶⁸

No obstante a lo anterior, es conocido que, si bien, con densidades hapténicas elevadas, se tiende a aumentar la intensidad de la respuesta inmunológica, también se sabe que, el título de afinada y los anticuerpos generados no aumentan linealmente con el incremento del número de haptenos enlazados a la proteína portadora.⁶⁹ Por otro lado, pese a que la respuesta inmune inducida por un conjugado con inferior densidad hapténica tiende a ser de baja intensidad, con frecuencia se obtienen anticuerpos de mayor afinidad.^{67,68,69}

4.1.3 Preparación del bioconjugado de ensayo de OVA

Lateral a la elaboración del bioconjugado inmunogénico de la BSA, también se desarrolló la generación de un bioconjugado de tapizado, en específico de OVA, para ser usado en el proceso de valoración de la respuesta inmune. Para estos tipos de evaluación, es común emplear ensayos ELISA, en el que se utiliza el bioconjugado OVA-hapteno generalmente fijado a la placa a través de absorción pasiva, fase que se identifica como tapizado en un inmunoensayo ELISA de formato indirecto o de conjugado inmovilizado.

Para la obtención del bioconjugado mtx-C-OVA se siguió un esquema de conjugación similar al descrito para el conjugado de BSA, pero con algunas particularidades. En este caso, el experimento se diseñó para conseguir una $RM_0=21$ en base a la disposición de los residuos de l-lisina en la proteína OVA (**Figura 24**).⁴⁶

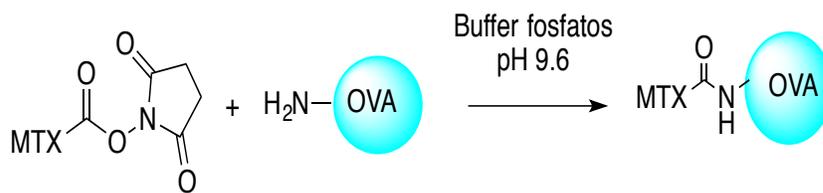


Figura 24. Síntesis del bioconjugado de mtx-C-OVA.

El proceso de purificación y tratamiento final del bioconjugado mtx-C-OVA, también fue similar al descrito para la BSA, a excepción que el bioconjugado se conservó a -20°C con una concentración de 0.02% timerosal. De igual manera, se determinó también la carga hapténica por el método de las absorbancias aditivas, y se preparó de manera paralela, una alícuota liofilizada para determinar la carga hapténica por espectrometría de masas MALDI/TOF.⁵⁷

En la **figura 25** se muestran los espectros UV/vis del hapteno mtx-C, de la proteína OVA y del conjugado mtx-C-OVA. En el espectro correspondiente a este último, se observa una modificación significativa, que presumiblemente sea ocasionada por la incorporación covalente del hapteno mtx-C en los residuos de l-lisina de la proteína.

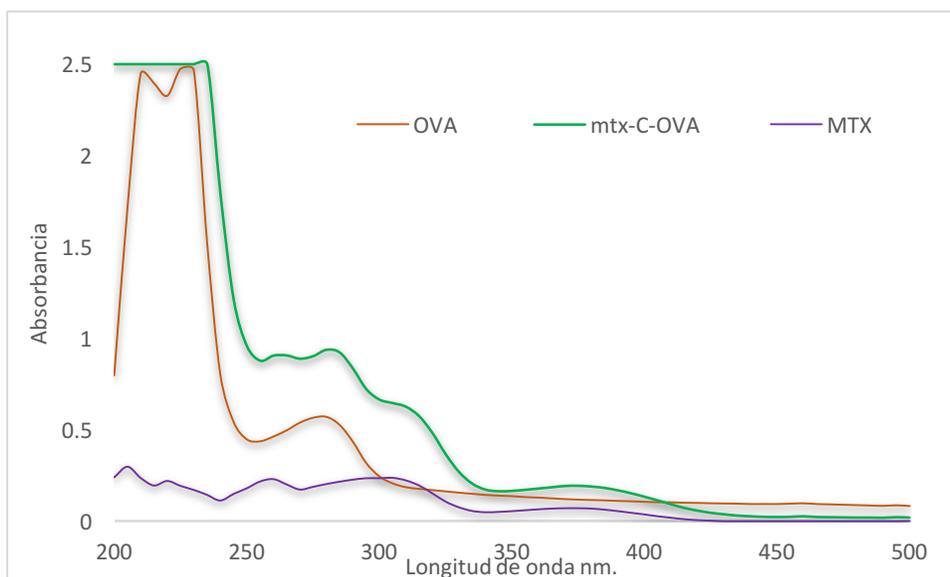


Figura 25. Espectros de absorción UV/vis del hapteno mtx-C (morado), OVA (rojo) y el bioconjugado mtx-C-OVA (verde).

Por tratamiento similar a lo realizado para la proteína BSA, toda vez que se obtuvieron los valores de los coeficientes de extinción molar tanto para el hapteno como para la proteína OVA, resultó notablemente encontrar valores de ϵ altos, del orden de $20,000\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o superiores para longitudes de onda cercanas a 280 nm (**tabla 10**).

Tabla 10. Coeficientes de extinción molar para la proteína OVA

λ (nm)	$\epsilon \lambda^P$ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
	OVA
250	10.78
260	14.58
270	21.64
280	24.99
290	15.43
400	-
M_r (g/mol)	44300

A partir de los datos anteriores, se calculó la carga hapténica en el bioconjugado de OVA aplicando el método de las absorbancias aditivas. Los resultados se muestran en la **tabla 11**.^{66,70}

Tabla 11. Carga hapténica del conjugado mtX-C-OVA obtenida por espectroscopia UV-vis.

Longitud onda	C(OVA)		C(MTX)	RM
	(mM)	(mg/mL)	(mM)	(n_H/n_P)
260	2.257×10^{-2}	1	0.023734122	1.051421607
280	2.257×10^{-2}	1	0.018054248	0.799803184

n_H número de moles del hapteno.

n_P número de moles de la proteína.

Los resultados encontrados por este método, denotaron una carga hapténica muy baja, una relación molar n_H/n_P del orden de la unidad, cuando se estila obtener cargas hapténicas de entre 10 y 12 haptenos/proteína para bioconjugados de tapizado.⁷¹

Por otro lado, la determinación de tal densidad hapténica por espectrometría de masas MALDI/TOF, tal como se observa en la **figura 26**, también ratificó la baja relación hapteno-proteína, aunque el dato encontrado por éste procedimiento, hizo referencia a una RM_f del orden de tres moléculas del hapteno mtX-C por unidad de proteína OVA. Diferentes procedimientos se probaron a razón de incrementar la carga hapténica en la proteína OVA, sin embargo, los mejores resultados encontrados fueron alrededor de

valores similares. Ante tal situación, creímos prioritario ensayar el bioconjugado mtx-C-OVA para valorar su viabilidad como inmunorreactivo en un inmunoensayo c-ELISA, tal como lo ejecutaron con éxito Wang y Cols (2014), Bremer y Janda (2017) para los bioconjugados de OVA de algunas micotoxinas como la Ocratoxina.^{70,72}

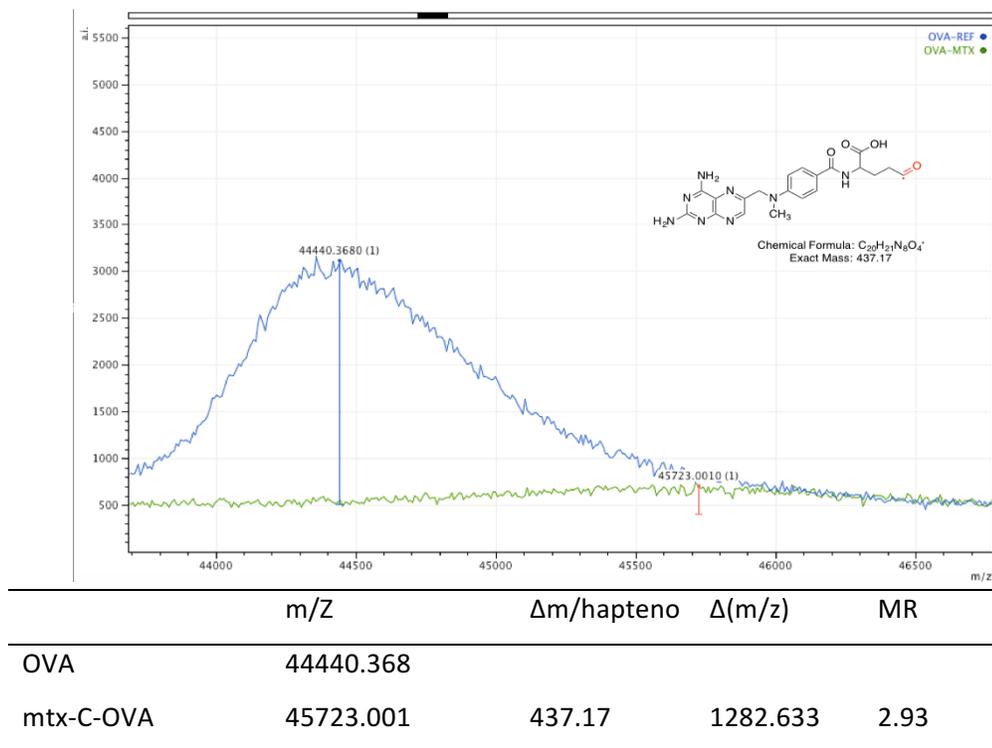


Figura 26. Comparación de los espectros de masas de la proteína OVA (azul) y el bioconjugado mtx-C-OVA (verde).

4.1.4 Preparación del bioconjugado de señalización de HRP

El bioconjugado de mtx-C-HRP, es conocido como trazador enzimático o conjugado de señalización justamente por su capacidad de generar una señal medible en el desarrollo de un inmunoensayo. En un inmunoensayo c-ELISA directo, donde los anticuerpos se anclan a la placa mediante absorción pasiva, éste tipo de trazador enzimático es ampliamente utilizado por su robustez analítica en ese contexto.

Para la obtención del bioconjugado se siguió un esquema de conjugación similar al descrito para el conjugado de BSA, pero con algunas particularidades. En este caso, el experimento se diseñó para conseguir una $RM_0=10$ en base a la disponibilidad de los

residuos de l-lisina de la proteína HRP, buscando no saturar los sitios de unión para evitar la pérdida de la capacidad enzimática (**Figura 27**).⁴⁶

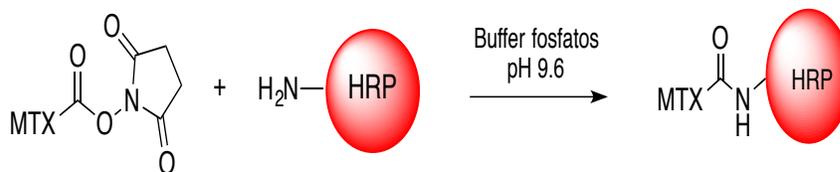


Figura 27. Síntesis del bioconjugado de mtx-C-HRP.

El proceso de purificación y tratamiento final del bioconjugado mtx-C-HRP, también fue similar al descrito para la BSA, excepto que el bioconjugado se conservó a 2 °C con una concentración de 0.02% de timerosal y se diluyó 1:1 con buffer de fosfatos pH 7.4 que contiene BSA al 0.1 %w/v; de igual manera, se determinó también la carga hapténica por el método de las absorbancias aditivas, a la par que, se preparó una alícuota liofilizada para determinar la carga hapténica por espectrometría de masas MALDI/TOF.⁵⁷

En la **figura 28** se muestran los espectros de absorción del hapteno mtx-C, de la proteína HRP y del conjugado mtx-C-HRP. En el espectro correspondiente a este último, se observó una modificación significativa, que presumiblemente se ocasionó por la incorporación covalente del hapteno mtx-C en los residuos de l-lisinas disponibles en la proteína.

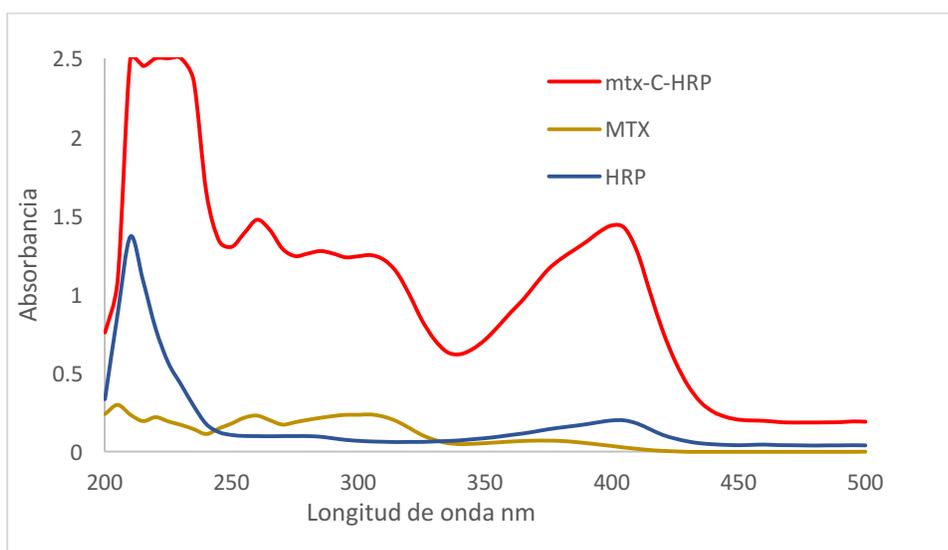


Figura 28. Espectro de absorción UV/vis del conjugado mtx-C-HRP.

En la **tabla 12**, se exhibe como a partir de los datos de los coeficientes de extinción molar tanto del hapteno como de la proteína HRP, obtenidos por tratamiento similar a la BSA, fue posible obtener los valores de ϵ a cada longitud de onda. A partir del valor de ϵ más alto, que se correspondió a una $\lambda = 400$ nm, se calculó la relación molar final proteína-hapteno. En éste caso, dicha relación se correspondió con un valor por debajo de la unidad a través de ésta metodología.⁵⁷

Tabla 12. Coeficientes de extinción molar para la proteína HRP y valor de densidad hapténica en el bioconjugado mtX-C-HRP calculada por UV-vis

λ (nm)	ϵ_{λ}^P (mM ⁻¹ cm ⁻¹) HRP	RM (n_H/n_P) ^a	Longitud de onda
250	-		
260	20.45		
270	20.78	0.44	400 nm
280	20.56		
290	-		
400	65.38		
M_r (g/mol)	44000		

^a (n_H) número de moles del hapteno/ (n_P) número de moles de la proteína.

De igual manera que en los casos de los bioconjugados de BSA y OVA antes descritos, se determinó la carga hapténica por espectrometría de masas MALDI/TOF. En la **figura 29** se exhiben los espectros de masas de la enzima HRP y del bioconjugado correspondiente. Ahora, por ésta metodología efectivamente se corroboró una carga hapténica del orden de una unidad de hapteno por unidad proteica.

Para este tipo de bioconjugados, se ha descrito que la densidad hapténica capaz de conseguirse en función de los grupos $-NH_2$ disponibles en la enzima HRP, varía entre 1 – 2 unidades de hapteno/proteína.^{73,74}

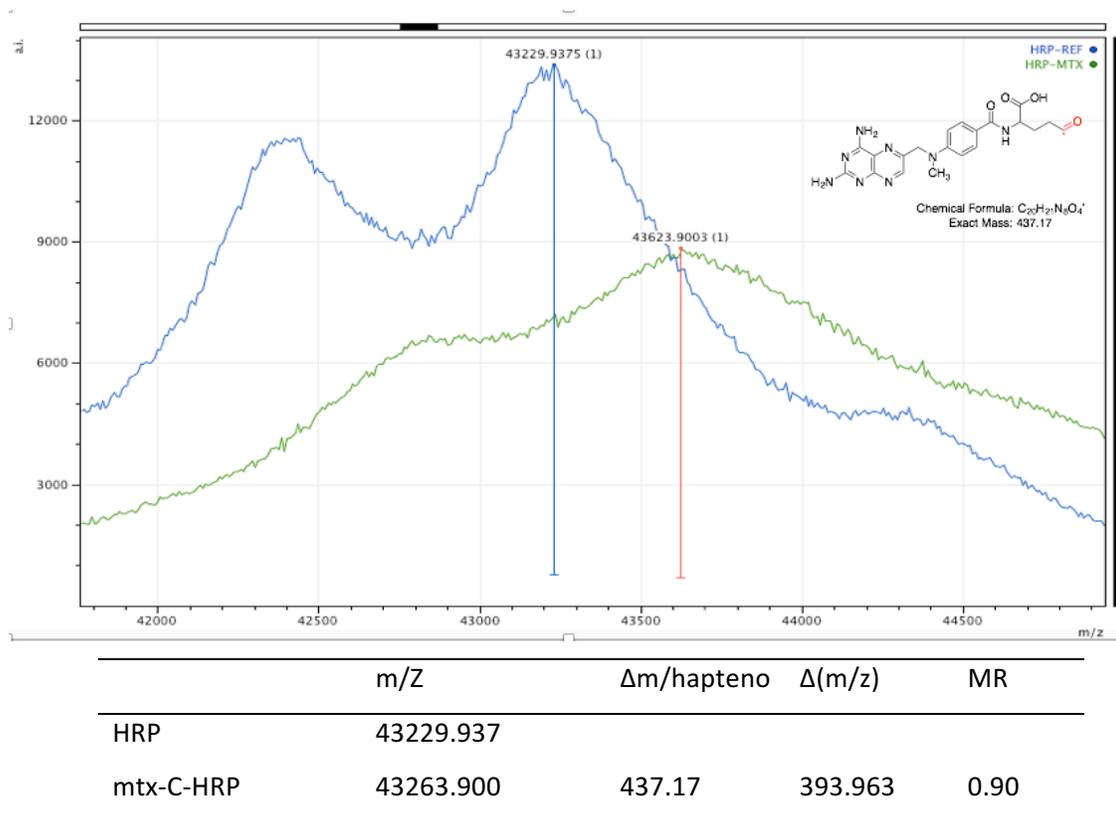


Figura 29. Comparación de los espectros de masas para la referencia de la enzima HRP (azul) y el bioconjugado mtx-C-HRP (verde).

4.2 Viabilidad de los bioconjugados de MTX

Toda vez sintetizados y caracterizados los bioconjugados correspondientes en términos de carga hapténica, se buscó demostrar la viabilidad de cada uno de ellos en función de su desempeño como inmunorreactivo. En este contexto, resultaba evidente que, si se lograba generar anticuerpos policlonales (pAb) capaces de reconocer al metotrexato, quedaría así probada la viabilidad del bioconjugado inmunizante mtx-C-BSA; adicionalmente, la eventual sensibilidad de tales anticuerpos, se mediría en términos de valores de IC_{50} en un inmunoensayo ELISA en el formato que presentase mayores prestaciones analíticas como estabilidad y/o reproducibilidad. Adicionalmente, su desempeño sería sensible a la correcta aplicación de un esquema de inmunización en dos conejos new Zealand hembra para verificar el potencial de activar la respuesta inmunológica de los animales, por la producción de anticuerpos capaces de reconocer al

metotrexato. El protocolo consistió en aplicar cuatro dosis de 300 µg del inmunógeno por conejo tal como se puede revisar a detalle en la **sección 3.3.2** del capítulo 3.

Asimismo, para los bioconjugados de ensayo, mtx-C-OVA y mtx-C-HRP la viabilidad como inmunorreactivos se verificaría mostrando capacidad para realizar un inmunoensayo en placa ELISA bajo un esquema de doble finalidad. Esto es, por un lado, se probaría su viabilidad utilizando anticuerpos policlonales hacia el metotrexato de disposición comercial, y luego por otro lado, se ensayarían frente a los antisueros policlonales generados en los animales de experimentación que fueron inmunizados con mtx-C-BSA.

4.2.1 Desempeño del bioconjugado mtx-C-BSA

Con el afán de verificar el desarrollo del proceso de inmunización se realizó un sangrado parcial en ambos conejos en la vena auricular de cada animal. El suero se ensayó utilizando anticuerpos policlonales de cabra anti-MTX marcados con streptavidina de disposición comercial en un ensayo de ausencia-presencia de reconocimiento. El resultado de ésta prueba mostró un proceso de inmunización muy pobre, con casi ausencia de inhibición para el conejo A, mientras que para el conejo B, apenas si se apreció una ligera inhibición a título del metotrexato de 10^2 µM en ensayo. Un tanto desalentados y motivados únicamente por la experiencia en el grupo de investigación en éste tipo de comportamiento, decidimos continuar con el procedimiento aun cuando en este punto consideramos que la viabilidad del conjugado de inmunización no era favorable.

Al finalizar el cuadro de inmunización los animales se exanguinaron y del suero obtenido se precipitaron los anticuerpos policlonales (pAb) de cada animal. La evaluación de los pAb provenientes de cada animal, se realizó mediante ensayos ELISA competitivos en formato directo e indirecto. En estos ensayos se encontró que los anticuerpos del **conejo A** generaban respuestas de reconocimiento muy bajas a nulas, en ambos formatos del inmunoensayo. Mientras que los anticuerpos pAb B del **conejo B** sí presentaban inhibición y los siguientes trabajos de caracterización se enfocaron a éstos anticuerpos.

En el caso del ensayo **c-ELISA en formato directo**, los resultados no fueron favorables, aun cuando a simple vista se observó reconocimiento de los anticuerpos por el MTX y el bioconjugado de señalización mtx-C-HRP (ver ilustración de la placa en la **Figura**

30); la inhibición no fue significativa ni reproducible en las curvas de inhibición al momento de graficar los datos, obteniendo así curvas sigmoides poco definidas. En el caso del bioconjugado de señalización mtx-C-HRP, cabe mencionar que efectivamente sí resultó viable en términos de generar señal en el inmunoensayo, aunque el desempeño de los pAb B en el formato directo no presentaron su mejor desempeño. El comportamiento observado en el inmunoensayo en este formato, no resulta atípico cuando se trata de encontrar el formato de un ensayo ELISA donde los anticuerpos generados exhiban sus mejores características analíticas.^{67,72}

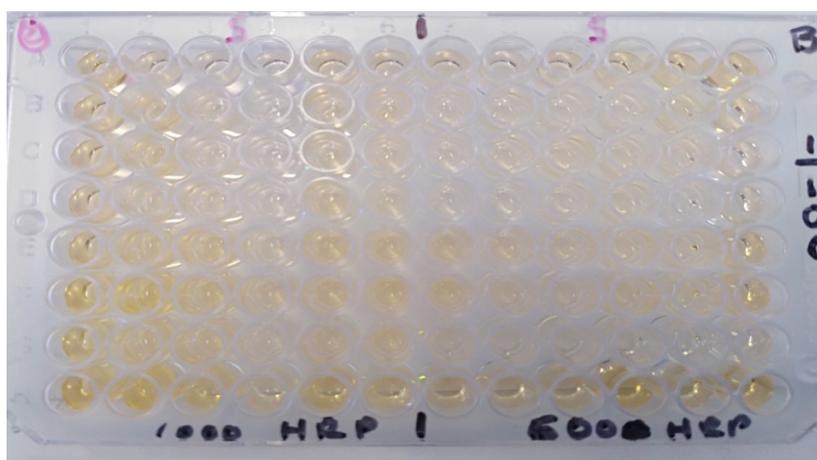


Figura 30. Placa de inmunoensayo c-ELISA directo, en el cual no se observa una inhibición definida utilizando concentraciones de mtx-C-HRP de 1000 y 600 ng/mL.

Ahora bien, el desempeño de los anticuerpos pAb B en el inmunoensayo **c-ELISA en formato indirecto**, se observó un comportamiento contrario. Tal como se puede observar en la **figura 31**, los anticuerpos exhibieron inhibición muy definida, lo cual es indicativo de la afinidad que presentan éstos policlonales por el MTX y la viabilidad de competencia bioconjugado de tapizado mtx-C-OVA obtenido en este trabajo.

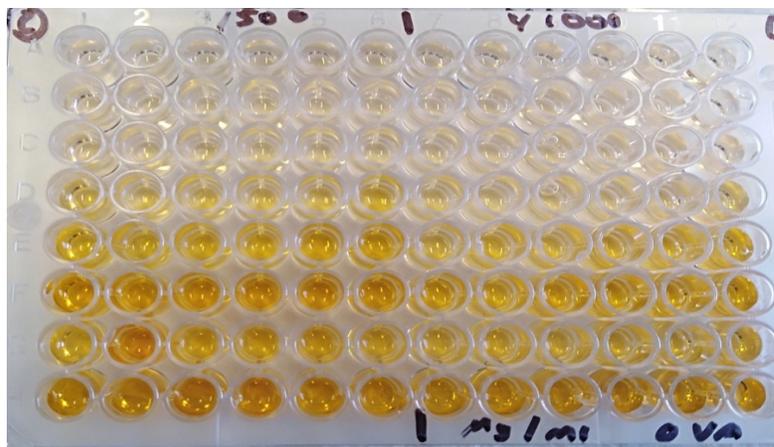


Figura 31. Placa de inmunoensayo c-ELISA indirecto, con tapizado a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mtX-C-OVA.

Llegados a éste punto, y habiendo seleccionado el formato indirecto del inmunoensayo ELISA competitivo sobre el que se trabajaría, se realizaron ensayos dirigidos a conocer las condiciones experimentales óptimas, en términos de precisar las concentraciones de los inmunorreactivos donde los anticuerpos pAb B podrían exhibir sus mejores prestaciones analíticas de sensibilidad por el analito.

En ese sentido, se ensayaron en todos los casos por triplicado, diferentes concentraciones del conjugado mtX-C-OVA de tapizado que variaron desde 2.0, 1.0, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, encontrando que los mejores resultados de relación señal/inhibición fueron a 2.0 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; valores típicamente altos para un inmunoensayo con anticuerpos monoclonales, pero dentro del rango de trabajo en el performance inmunoanalítico con anticuerpos policlonales.^{75,76} Así pues, a razón de evitar una saturación del bioconjugado de tapizado en el inmunoensayo, se determinó trabajar con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del bioconjugado de tapizado mtX-C-OVA.

Las diluciones del anticuerpo pAb B que se ensayaron y que presentaron mejores características tanto de señal (valores de absorbancia altos en torno a una unidad de absorbancia) e inhibición (en términos de valores de IC_{50}) para el formato en trabajo, fueron los títulos de dilución a 1:500 y 1:1000 respectivamente. Para ambas diluciones, los inmunoensayos se realizaron por triplicado, empleando curvas estándar del analito (MTX) completas de siete puntos, desde 1000 nM en ensayo con factor de dilución 10, más un blanco analítico. De esta manera, se generaron las curvas de inhibición para cada una de las

diluciones de anticuerpos, graficadas como curvas sigmoides paramétricas tal como se mencionó en la sección introductoria.²⁴

Para la dilución 1:1000 del anticuerpo pAb B, la **figura 32** muestra las curvas de inhibición para cada réplica del inmunoensayo realizado. Para esta dilución de anticuerpo se obtuvo un valor de IC₅₀ promedio de aproximadamente de 1 nM como se observa en el valor paramétrico C de la curva sigmoide de los datos al pie de la gráfica.

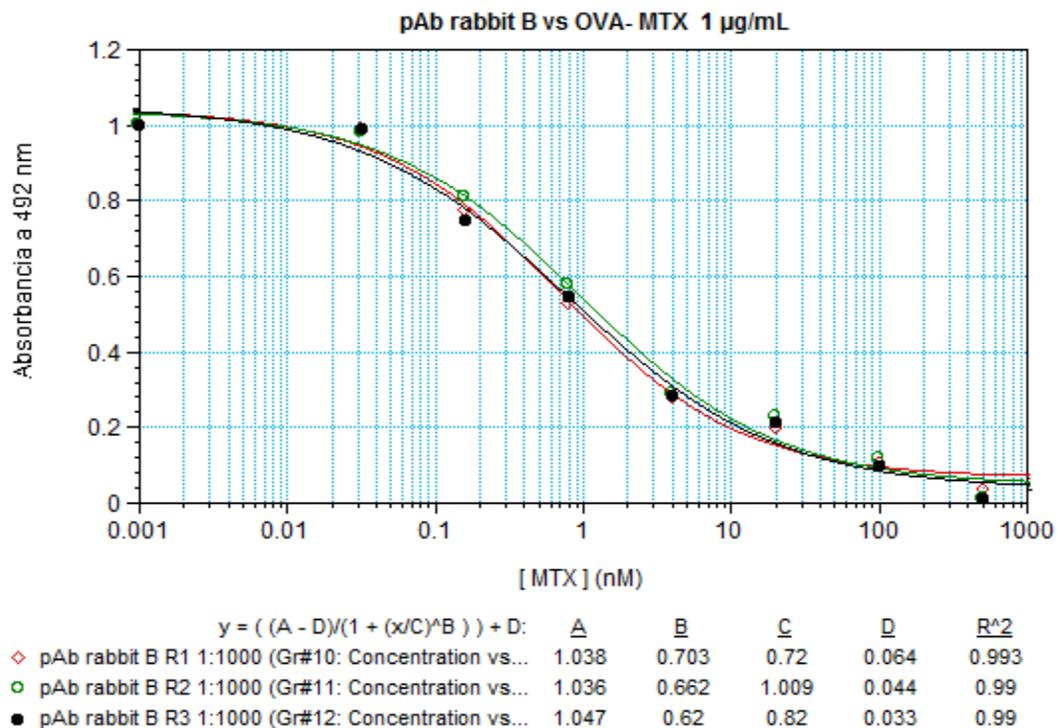


Figura 32. Curva de inhibición del inmunoensayo c-ELISA indirecto con pAb B dilución 1:1000

Luego, repitiendo el mismo tratamiento, pero ahora empleando un título de anticuerpos pAb B 1:500, para el inmunoensayo c-ELISA indirecto, se encontró como se ilustra en la **figura 33**, un valor de IC₅₀ del orden de 3.0 nM en curvas sigmoides de inhibición mejor ajustadas a los valores asintóticos de máxima y mínima absorción, respecto a las exhibidas a títulos de dilución del pAb B 1:1000.

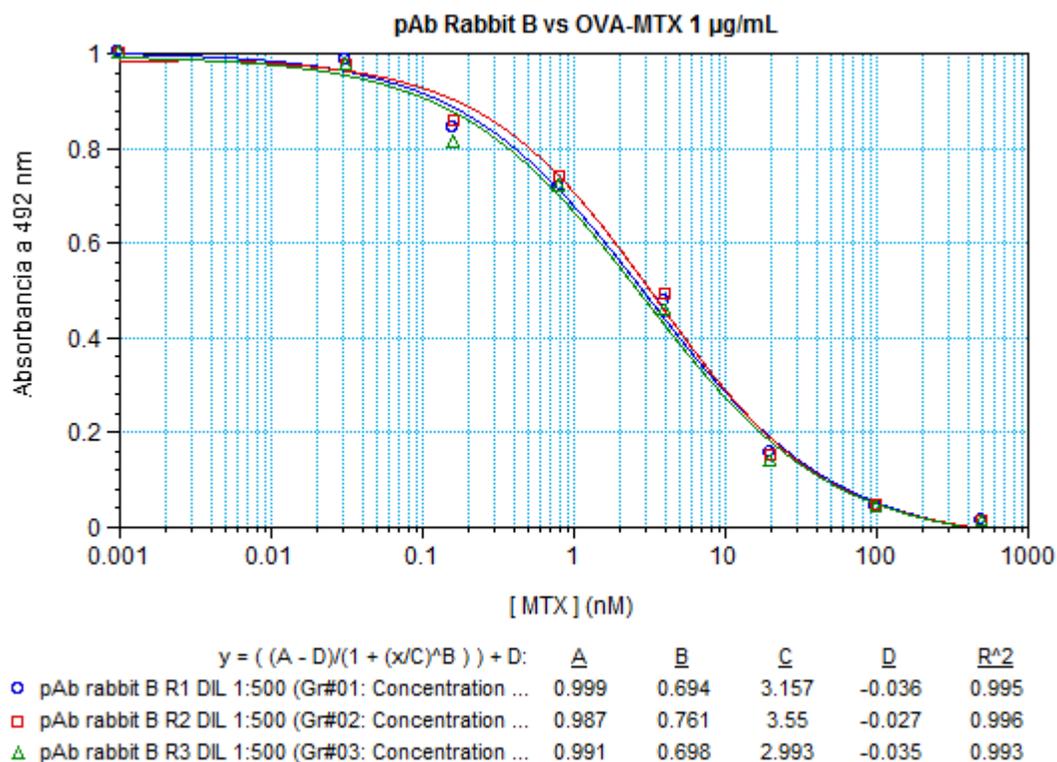


Figura 33. Curva de inhibición del inmunoensayo c-ELISA indirecto con pAb B 1:500

Los resultados de caracterización de los bioconjugados del metotrexato abordados en el presente trabajo, resultaron concluyentes respecto a su viabilidad como inmunorreactivos clave para la obtención de un inmunoensayo tipo ELISA. Resultó especialmente reseñable el hecho de haber obtenido anticuerpos policlonales de conejo que presentan características de sensibilidad hacia el metotrexato en términos de valores de IC₅₀ entre 1 a 3 nM en un ensayo ELISA competitivo en formato indirecto.

No obstante que esta investigación se ha dirigido a la obtención de bioconjugados del metotrexato y su caracterización, como una primera etapa de investigación dirigida a la obtención de anticuerpos de alta sensibilidad hacia este analito, y a partir de la cual, se formuló la construcción de diferentes haptenos del metotrexato descritos al inicio del trabajo, consideramos al momento de la escritura y basados tanto en circunstancias de tiempo y a los resultados obtenidos empleando únicamente el hapteno mtx-C-BSA como inmunógeno, no intentar, al menos como objetivo prioritario, abordar la construcción de los otros haptenos formulados. Antes bien, enfocar el esfuerzo de investigación a la

estandarización del inmunoensayo c-ELISA en el formato indirecto que parece ser prometedor por los términos de sensibilidad que exhibe para la detección del metotrexato y, por otro lado, abordar la obtención de anticuerpos monoclonales con este mismo objetivo.

5. Conclusiones

A tenor del objetivo principal del presente trabajo de investigación: obtención de bioconjugados proteicos del metotrexato para su empleo como inmunorreactivos, se ha logrado cumplir. Los bioconjugados del metotrexato generados permiten su aplicación en un inmunoensayo enzimático en soporte sólido tipo ELISA, de tipo competitivo en formato indirecto, exhibiendo buena sensibilidad para detectar éste fármaco. Esa capacidad se derivó gracias al bioconjugado proteico de BSA que se empleó como inmunógeno y permitió acceder a anticuerpos policlonales sensibles hacia el metotrexato. A lo largo de este desarrollo:

- Se acopló covalentemente el metotrexato a cada proteína a través de un enlace amida por la formación química de un éster activo de *N*-hidroxisuccimidilo de uno de los carboxilatos que presenta la molécula del fármaco con los grupos amino libres de los residuos de *l*-lisina de la proteína.
- A partir del inmunógeno de BSA utilizado para inmunizar, se han conseguido anticuerpos policlonales de conejo de buena afinidad hacia el metotrexato. Con dichos anticuerpos se han podido llevar a cabo ensayos c-ELISA indirectos con sensibilidad, en término de valores de IC_{50} , del orden nanomolar. Límite estimado por debajo, en varios ordenes de magnitud, a los detectados por técnicas instrumentales de HPLC cercanos a $0.05 \mu\text{mol}$.
- Los bioconjugados de OVA y HRP del metotrexato obtenidos, han demostrado ser viables para su empleo como inmunorreactivos de ensayo. Por su parte, el bioconjugado de OVA, ha presentado un comportamiento analítico esperado como inmunorreactivo de tapizado al generar señales de absorbancia del ensayo ELISA superiores a la unidad de absorbancia. Por otra parte, el bioconjugado enzimático de HRP, mostró su funcionalidad como trazador enzimático, aunque en el inmunoensayo ELISA en formato directo, los anticuerpos ensayados no exhibieron curvas de inhibición analíticamente interesantes.
- Finalmente, los hallazgos encontrados en nuestra investigación en términos de densidades hapténicas bajas en todos los bioconjugados obtenidos, refuerzan el

concepto: cargas hapténicas bajas generan respuestas inmunes bajas, pero anticuerpos de alta sensibilidad. En este sentido, el esfuerzo de investigación recae en realizar *screening* exhaustivos de los antisueros en búsqueda de aquéllos anticuerpos de mayor sensibilidad.

6. Referencias

1. **Ramírez Ortiz Nancy.** 2017. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, Farmacovigilancia, acciones y programas, Gobierno de México. Recuperado de: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Farmacovigilancia/Farmacovigilancia.aspx>
2. **Ignacio Buffone, Agostina Werneke.** Characterization of drug poisoning among adolescents seen at the municipal hospital of Bahía Blanca. *Arch Argent Pediatr*, **2018**, 116(4):279-282.
3. **Ortega Castro R, Escudero Contreras A, Calvo Gutiérrez J, Castro Villegas M del C, Collantes Estévez E.** Óptima utilización del metotrexato. *Semin la Fund Española Reumatol*, **2013**, 14(1):24–7.
4. **Leslie Escobar.** Therapeutic drug monitoring and practical aspects of pharmacokinetics. *Revista Médica Clínica Las Condes*, **2016**, 27(5):605-14.
5. **Dasgupta Amitava.** Therapeutic Drug Monitoring: Newer: Drugs and Biomarkers. First edit, *Academic Press, San Diego*, **2012**, p.468.
6. **Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M.** Immunosuppressive Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.*, **2013**, 3(9).
7. **Carlos Goicoechea García.** Farmacología del metotrexato. *Reumatología Clínica Suplementos*, **2016**, 11(1),3-7.
8. **Rubino FM.** Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. **2001**, 764(1–2):217–54.
9. **Genestier L, Paillet R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard J-P.** Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*. mayo de **2000**, 47(2-3), 247-57.
10. **Treon SP, Chabner BA.** Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* **1996**, 42:1322–9.
11. **Mulder MB, Huisman R, Engels FK, van der Sluis IM, Koch BCP.** Therapeutic Drug Monitoring of Methotrexate in Plasma Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry: Necessary After Administration of Glucarpidase in Methotrexate Intoxications. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2018** 40(4), 383-5.
12. **David Sandoval, Graciela S. Alarcón.** Metotrexato y su uso en el tratamiento de enfermedades reumáticas. *Facultad de medicina de Alabama*, **1996**, vol 57.
13. **Lotfi M, Moniruzzaman M, Mutalib MIA, Wilfred CD, Alitheen NB, Goto M.** Analysis of Multiple Solvation Interactions of Methotrexate and Ammonium Based Ionic Liquids Using COSMO-RS. *Procedia Engineering*. **2016**, 148, 459-66.

14. **Juan Carlos Pérez Hernández, José Padilla Ochoa.** Intoxicación por metotrexato en una paciente con artritis reumatoide. *Asociación Mexicana de Medicina de Urgencia.* **2012**, (4) 125-130.
15. **Coskun M, Steenholdt C, de Boer NK, Nielsen OH.** Pharmacology and Optimization of Thiopurines and Methotrexate in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Pharmacokinetics.* **2016**, 55(3),257-74.
16. **Subaihi A, Trivedi DK, Hollywood KA, Bluett J, Xu Y, Muhamadali H,** Quantitative Online Liquid Chromatography–Surface-Enhanced Raman Scattering (LC-SERS) of Methotrexate and its Major Metabolites. *Analytical Chemistry.* **2017**, 89(12), 6702-6709.
17. **Colebatch AN, Marks JL, Van der Heijde DM, Edwards CJ.** Safety of nonsteroidal antiinflammatory drugs and/or paracetamol in people receiving methotrexate for inflammatory arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol Suppl.* **2012**, 62-73.
18. **Bluett J, Riba-Garcia I, Hollywood K, Verstappen SMM, Barton A, Unwin RD.** A HPLC/MS based method for the detection and quantification of methotrexate in urine at doses used in clinical practice for patients with rheumatological disease: a potential measure of adherence. *The Analyst.* **2015**, 140(6),1981-1987.
19. **Cowcher DP, Jarvis R, Goodacre R.** Quantitative Online Liquid Chromatography-Surface-Enhanced Raman Scattering of Purine Bases. *Analytical Chemistry.* **2014**, 86(19) 9977-9984.
20. **Albertioni F, Rask C, Eksborg S, Poulsen JH, Pettersson B, Beck O,** Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma. *Clin Chem.* **1996**, 42(1), 39-44.
21. **Montemurro M, De Zan MM, Robles JC.** Optimized high performance liquid chromatography–ultraviolet detection method using core-shell particles for the therapeutic monitoring of methotrexate. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*, **2016**, 6(2), 103-111.
22. **Sonemoto E, Kono N, Ikeda R, Wada M, Ueki Y, Nakashima K.** Practical determination of methotrexate in serum of rheumatic patients by LC-MS/MS: LC-MS/MS determination of methotrexate. *Biomedical Chromatography.* **2012**, 26(11), 1297-1300.
23. **Uchiyama M, Matsumoto T, Matsumoto T, Jimi S, Takamatsu Y, Tamura K and Hara S.** Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction. *Biomedical Chromatography* **2012**, 26, 76–80.
24. **Guillermo Quiñones Reyes.** Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos. PhD. UNIVERSIDAD DE VALENCIA, España, **2016**.

- 25. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Cellular and molecular immunology. Eighth edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, **2015**, Chapter 5, 87-106.
- 26. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Rivera Muñoz B.** Kuby inmunología. McGraw Hill; **2015**, chapter 3, 80-90.
- 27. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC.** ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls. *PROTEOMICS. Clinical Applications.*, **2015**, 9(3-4), 406-422.
- 28. Kohler, G., Milstein, C.,** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, 256, 495–497.
- 29. Aydin S.** A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. **2015**, 72:4-15.
- 30. Hornbeck P.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*. **1992**, 1(1):2.1.1-2.1.22.
- 31. K. Kato, Y. Hamaguchi, S. Okawa.** Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *J Biochem*, **1977**, 82:261-6.
- 32. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, **2018**, 72(1):32-42.
- 33. Belanger L, Sylvestre C, Dufour D.** Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clinica Chimica Acta*, **1973**, 48(1)15-8.
- 34.- Van Weemen BK, Schuurs AHWM.** Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, **1971**, 15(3):232-6.
- 35. Watanabe E, Miyake S, Yogo Y.** Review of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) for Analyses of Neonicotinoid Insecticides in Agro-environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61(51):12459-72.
- 36. Lindstrom P, Wager O.** IgG Autoantibody to Human Serum Albumin Studied by the ELISA-Technique. *Scandinavian Journal of Immunology*, **1978**, 7(5):419-25.
- 37. Boster Biological Technology.** ELISA Handbook Principle, Troubleshooting, Samples preparation and Assay Protocols.
- 38. Alcantarilla Ceballos Eric, Antonio Abad Somovilla.** Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis en alimentos de fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa. Universitat de València; **2017**.

- 39. Garcés García Marta, Maqueira Catalá Ángel.** Inmunoensayos Rápidos para la Determinación de Residuos de Plaguicidas Organofosforados en Aceite de Oliva. Universidad Politécnica de Valencia; **2008**.
- 40. Aumente MD, López-Santamaría J, Donoso-Rengifo MC, Reyes-Torres I, Montejano Hervás P.** Evaluation of the Novel Methotrexate Architect Chemiluminescent Immunoassay: Clinical Impact on Pharmacokinetic Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, **2017**, 39(5), 492-498.
- 41. García-Campaña, AM, Baeyens WRG, Zhang X, Ales F, Gamiz L.** Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence. *Ars Pharmaceutica*. **2001**. 42, 81-107.
- 42. Bouquié R, Grégoire M, Hernando H, Azoulay C, Dailly E, Monteil-Ganière C,** Evaluation of a Methotrexate Chemiluminescent Microparticle Immunoassay. *Am J Clin Pathol*, **2016**, 1;146(1):119–24.
- 43. Evans W, Pratt C, Taylor RH, Barker L, Crom W.** Pharmacokinetic monitoring of high-dose methotrexate. *Cancer Chemother Pharmacol*, **1979**, 3,161–166.
- 44. Günther V, Mueller D, von Eckardstein A, Saleh L.** Head to head evaluation of the analytical performance of two commercial methotrexate immunoassays and comparison with liquid chromatography-mass spectrometry and the former fluorescence polarization immunoassay. *Clin Chem Lab Med*. **2016**, 1;54(5):823-31.
- 45. Harlow, E., Lane, D.** Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory: *Cold Spring Harbor*, **1988**.
- 46. Hermanson GT.** Bioconjugate Techniques. Ed Elsevier Inc., Academia Press. Third Edition, Rockford, ILL, USA, **2013**, Chapter 1,11,12, p. 1-10, 465-469, 989-1016.
- 47. Nosrati H, Salehiabar M, Davaran S, Danafar H, Manjili HK.** Methotrexate-conjugated L-lysine coated iron oxide magnetic nanoparticles for inhibition of MCF-7 breast cancer cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. **2018**, 44(6):886-94.
- 48. Zhu Y-P, Mampuy P, Sergeev S, Ballet S, Maes BUW.** Amine Activation: N -Arylamino Acid Amide Synthesis from Isothioureas and Amino Acids. *Advanced Synthesis & Catalysis*. **2017**, 359 (14):2481-98
- 49. Leiro V, Parreira P, Freitas SC, Martins MCL, Pêgo AP.** Conjugation Chemistry Principles and Surface Functionalization of Nanomaterials. *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*. Elsevier, **2018**, p. 35-66.
- 50. Yan X, Zhao Y, Zhang Y, Qu H.** Monoclonal Antibodies and Immunoassay for Medical Plant-Derived Natural Products: A Review. *Molecules*, **2017**, 22(3):355.
- 51. Dehghani S, Nosrati R, Yousefi M, Nezami A, Soltani F, Taghdisi SM,** Aptamer-based biosensors and nanosensors for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF): A review. *Biosensors and*

- 52. Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlén M.** The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *ELECTROPHORESIS*, **2005**, 26(3):501-10.
- 53. Wang J-T, Wang L, Ji X, Liu L, Zhao H.** Synthesis of Zwitterionic Diblock Copolymers with Cleavable Biotin Groups at the Junction Points and Fabrication of Bioconjugates by Biotin–Streptavidin Coupling. *Macromolecules*, **2017**, 50(6):2284-95.
- 54. Abad, A., Manclús, J. J., Mojarrad F., Mercader, J. V., M. A., Primo, J., Guardiola, V., Montoya, A.** Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to DDT and Related Compounds. *J Agric. Food Chem* **1997**, 45, 3694-3702.
- 55. Esteve-Turrillas, F.A, Abad-Somovilla, A. Quiñones-Reyes, G., Agulló, C Mercader, J. V., Abad-Fuentes, A.** Monoclonal Antibody-based immunoassays for cyprodinil residue analysis in QuEChERS-based fruit extracts. *Food Chemistry*, **2015**, 187, 530-536.
- 56. Martin Strohaln.** mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. <http://www.mmass.org/>
- 57. Rodbard, D.** Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radio immunoassays and Immunoradiometric Assays. *Clin. Chem.* **1974**, 20, 1255-1270.
- 58. Leenaars M, Hendriksen CFM.** Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*, **2005**, 46(3):269-79.
- 59. Ahn KC, Gee SJ, Tsai H-J, Bennett D, Nishioka MG, Blum A, et al.** Immunoassay for monitoring environmental and human exposure to the polybrominated diphenyl ether BDE-47. *Environ Sci Technol*, **2009**, 43(20):7784-90.
- 60. Sulima A, Jalah R, Antoline JFG, Torres OB, Imler GH, Deschamps JR, et al.** A Stable Heroin Analogue That Can Serve as a Vaccine Hapten to Induce Antibodies That Block the Effects of Heroin and Its Metabolites in Rodents and That Cross-React Immunologically with Related Drugs of Abuse. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, 61(1):329-43.
- 61. Jain S, Mathur R, Das M, Swarnakar NK, Mishra AK.** Synthesis, pharmacoscintigraphic evaluation and antitumor efficacy of methotrexate-loaded, folate-conjugated, stealth albumin nanoparticles. *Nanomedicine*, **2011**, 6(10):1733-54.
- 62. Kanellos Jerry. Pietersz Geoffrey A. McKenzie Ian F.C.** Studies of Methotrexate-Monoclonal Antibody Conjugates for Immunotherapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. **1985**

- 63. Adam A, Rojas J, Pretel J, Martinez L, Ong H.** Labelling of haptenic drug with digoxigenin for competitive immunoassay: its application to lesopitron, a new anxiolytic agent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1996**, *15*(1), 13-9.
- 64. Angel E. Rivas M., Aaron A. Muñoz,** Absortion colorimetric test Using Digital Images, *FARAUTE Ciens. y Tec.*, **2008**, *3*(2): 41-47.
- 65. Singh KV, Kaur J, Varshney GC, Raje M, Suri CR.** Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chemistry*. **2004**, *15* 168-73.
- 66. Al-Shehri MM, El-Azab AS, El-Gendy MA, Hamidaddin MA, Darwish IA.** Synthesis of hapten, generation of specific polyclonal antibody and development of ELISA with high sensitivity for therapeutic monitoring of crizotinib. *Oiso N, editor. PLOS ONE*. **2019**, *14*(2), e0212048.
- 67. Kononenko GP, Burkin AA.** Immunoenzyme method for the determination of citrinin. *Journal of Analytical Chemistry*. **2007**, *62*(7):691-6.
- 68. Fodey TL, Greer NM, Crooks SRH.** Antibody production: Low dose immunogen vs. low incorporation hapten using salmeterol as a model. *Analytica Chemical*. **2009**, *637*(1-2), 328-32.
- 69. Jalah R, Torres OB, Mayorov AV, Li F, Antoline JFG, Jacobson AE, et al.** Efficacy, but Not Antibody Titer or Affinity, of a Heroin Hapten Conjugate Vaccine Correlates with Increasing Hapten Densities on Tetanus Toxoid, but Not on CRM₁₉₇ Carriers. *Bioconjugate Chemistry*. **2015**, *26*(6), 1041-53.
- 70. Wang X, Bao M, Wu J, Luo Y, Ma L, Wang Y, et al.** Characterization and Comparison of Ochratoxin A-Ovalbumin (OTA-OVA) Conjugation by Three Methods. *Journal of Integrative Agriculture*. **2014**, *13*(5), 1130-6.
- 71. Gefen T, Vaya J, Khatib S, Rapoport I, Lupo M, Barnea E, et al.** The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunology*. **2015**, *144*(1),116-26.
- 72. Bremer PT, Janda KD.** Conjugate Vaccine Immunotherapy for Substance Use Disorder. *Barker Pharmacological Reviews*. **2017**, *69*(3), 298-315.
- 73. Wang ST, Gui WJ, Guo YR, Zhu GN.** Preparation of a multi-hapten antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. **2007**, *587*(2), 287-92.
- 74. Quiñones-Reyes G, Agulló C, Mercader JV, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A.** Synthetic Haptens and Monoclonal Antibodies to the Cyanotoxin Anatoxin-a. *Angewandte Chemie International Edition*. **2019**, *58*(27), 9134-9.

75. Wang Y, Wei D, Yang H, Yang Y, Xing W, Li Y, et al. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples. *Talanta*. **2009**, 77(5), 1783-9.

76. Pilolli R, Chaudhari R, Palmisano F, Monaci L. Development of a mass spectrometry immunoassay for unambiguous detection of egg allergen traces in wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2017**, 409(6), 1581-9.

Anexos

Espectros de RMN

