



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TENDENCIA EN EL DESARROLLO DE MEDICAMENTOS  
BIOTECNOLÓGICOS**

*Trabajo Escrito vía cursos de educación continua*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

PAULINA BARRIENTOS GARCÍA



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: **GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ**

**VOCAL:** Profesor: **MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS**

**SECRETARIO:** Profesor: **RAÚL LUGO VILLEGAS**

**1er. SUPLENTE:** Profesor: **MARÍA EUGENIA IVETTE GÓMEZ SÁNCHEZ**

**2° SUPLENTE:** Profesor: **JORGE RAFAEL MARTÍNEZ PENICHE**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CD. UNIVERSITARIA, D.F.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M. en F. RAÚL LUGO VILLEGAS**

**SUSTENTANTE (S):**

**PAULINA BARRIENTOS GARCÍA**

# **AGRADECIMIENTOS**

***LO QUE SOMOS ES EL OBSEQUIO QUE DIOS NOS HACE***

***LO QUE LLEGAMOS A SER ES NUESTRO OBSEQUIO A DIOS***

## **A DIOS:**

Gracias a Dios por darme la fuerza para no darme por vencida y seguir adelante en cada cosa que me propongo, no caigo gracias a que El me cuida. El me saco de las tinieblas, me llevo hacia su luz, cada día que pasa es un regalo que me brinda.

Siempre está conmigo en cada momento, me guía, me protege, me consuela, es mi fortaleza y mi guía.

***Solo en Dios halla descanso mi alma; de él viene mi salvación.  
Sólo él es mi roca y mi salvación; él es mi protector.***

***Salmo 62:1-2***

## **A mis Padres:**

Por enseñarme que debes luchar cada día por lo que quieres y a no darme por vencida. A cada cosa que empieces en tu vida debes terminarla, sin importar lo obstáculos que se te presenten. Por cuidarme, protegerme y apoyarme siempre pase lo que pase.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>7</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1 BIOTECNOLOGÍA.....</b>	<b>9</b>
<i>Definición de biotecnología.....</i>	<i>9</i>
<i>Historia de la biotecnología.....</i>	<i>10</i>
<b>CAPÍTULO 2 MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.....</b>	<b>14</b>
<b><i>Definición de medicamento biotecnológico.....</i></b>	<b><i>14</i></b>
<i>Nacional.....</i>	<i>14</i>
<i>Internacional.....</i>	<i>15</i>
<b><i>Clasificación de medicamento biotecnológico.....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<i>Clasificación nacional.....</i>	<i>16</i>
<i>Clasificación internacional.....</i>	<i>16</i>
<b><i>Características de los medicamentos biotecnológicos.....</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b>CAPÍTULO 3 PROCESOS DE FABRICACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.....</b>	<b>19</b>
<b><i>Procesos Biotecnológicos Generalidades del ADN recombinante.....</i></b>	<b><i>19</i></b>
<i>Enzimas de restricción.....</i>	<i>21</i>
<i>Vectores.....</i>	<i>24</i>
<i>Construcción de bibliotecas.....</i>	<i>38</i>
<i>Identificación de secuencias clonadas.....</i>	<i>40</i>

<i>Marcadores moleculares</i> .....	40
<i>Sondas</i> .....	42
<i>Rastreo de Bibliotecas</i> .....	43
<i>Secuenciación de ADN</i> .....	45
<i>Mapas de restricción</i> .....	46
<b><i>Técnicas de separación y purificación</i></b> .....	48
<i>Electroforesis</i> .....	48
<i>Cromatografía</i> .....	56
<i>Reacción de polimerasa en cadena (PCR)</i> .....	70
<i>Técnicas Southern, Northern, Western, Microarrays y Proteómica</i> .....	72
<b>CAPÍTULO 4 MARCO LEGAL Y REGULATORIO</b>	
<b>MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS</b> .....	79
<b><i>Regulación</i></b>	
<i>Internacional</i> .....	79
<i>Nacional. Secretaría de Salud (SSA), Ley General de Salud (LGS), Reglamento de Insumos para la Salud (RIS), Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)</i> .....	81
<b>CAPÍTULO 5 REGISTRO SANITARIO</b>	
<b>MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS</b> .....	83
<b><i>El Artículo 222 La Ley General de Salud</i></b> .....	83
<b><i>Reglamento de Insumos para la Salud (RIS)</i></b> .....	84

<b>ETAPAS DE DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO (METODOLOGÍA).....</b>	<b>87</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>126</b>

# **TENDENCIA EN EL DESARROLLO DE MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS**

## **INTRODUCCIÓN**

Debido a la cantidad de enfermedades existentes y a la demanda de la población para tratarlas, los medicamentos se han convertido en una necesidad prioritaria. No solamente es importante la investigación, desarrollo y producción de los mismos sino que la garantía de alcanzar las reservas necesarias para cubrir a toda la población han derivado en la búsqueda de alternativas productivas para satisfacer esta demanda.

La biotecnología contribuye de múltiples formas a esta necesidad, ya que permite obtener gran cantidad de productos de forma segura y la creación de estos medicamentos mediante técnicas de manipulación genética, ha tenido un enorme beneficio y gran contribución a la industria farmacéutica, así como también a la población. Es así que estos medicamentos conocidos como medicamentos biotecnológicos, debido a su desarrollo y producción utilizan diversa técnicas de Ingeniería Genética<sup>36</sup>.

## **OBJETIVO.**

Determinar las etapas de fabricación para el desarrollo de medicamentos biotecnológicos.

## **JUSTIFICACIÓN**

La industria químico-farmacéutica ha generado a lo largo de los años, un conjunto muy importante de productos farmacéuticos que se utilizan en el tratamiento de diferentes problemas clínicos. Sin embargo, así como la industria ha avanzado a lo largo de los años, también las enfermedades han avanzado logrando ser más fuertes y resistentes cada día. Esto ha provocado un gran reto no solo para la

industria farmacéutica sino también para distintas disciplinas como son la Química, Biología, Medicina, Bioquímica, Ingeniería Bioquímica, etc.

De la combinación de estas disciplinas y la industria farmacéutica surge la biotecnología farmacéutica para el desarrollo de nuevos medicamentos; así se resuelven obstáculos que se tenían en la producción de los mismos y para brindar al sector salud una oportunidad más de combatir las enfermedades que hoy en día, miles de personas sufren a lo largo de todo el mundo.

# CAPÍTULO 1. BIOTECNOLOGÍA

## ***Definición de Biotecnología.***

- El término Biotecnología fue forjado en 1919 por el economista agrícola húngaro Kark Ereky para descubrir cómo se podían obtener los productos de materiales nuevos con la ayuda de organismos vivos.<sup>5</sup>
- La Biotecnología comprende el conjunto de procesos industriales que implican el uso del sistema biológico. En el caso de algunas de la industrias estos procesos abarcan el empleo de organismos obtenidos por Ingeniería Genética.<sup>5</sup>
- La Biotecnología es un conjunto de técnicas biológicas y desarrollo de fármacos que permiten descubrimientos biológicos y productos nuevos. Una gran cantidad de ellas ya existen a partir de las técnicas del ADN recombinante.<sup>6</sup> En resumen la biotecnología es el proceso que utiliza un conjunto de sistemas biológicos para el desarrollo de un producto.<sup>7</sup>
- *El Convenio sobre la diversidad biológica (CDB) define Biotecnología:* “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”.<sup>1,2</sup>

## ***Historia de la Biotecnología.***

A lo largo de la historia, la medicina y la farmacéutica siempre han estado juntas librando una enorme batalla por alcanzar la mejoría de la salud humana en todos los niveles.

El desarrollo de técnicas biológicas evolucionó a través de los años, comenzó con antiguas culturas como la china y la egipcia etc, donde con la utilización de microorganismos que es una técnica, la fermentación, produjeron vino, queso, yogurt y pan.

Siguiendo con mejoras importantes en las áreas de medicina, microbiología, farmacéutica, en técnicas microscópicas, el desarrollo de técnicas asépticas, la esterilización y la pasteurización; el cultivo de cepas microbianas en medios de cultivos y el aislamiento de estas en el laboratorio, lograron desarrollar medicamentos adecuados usando la combinación de estas técnicas, un ejemplo es el desarrollo de la penicilina en la II Guerra Mundial, que dio como resultado avances importantes en técnicas de esterilización a gran escala, mejora de las instalaciones de fermentación, cultivo, aislamiento y reproducción del hongo del género *Penicillium*.

Sin embargo, las enfermedades han avanzado debido a los cambios genéticos en distintos microorganismos ya sea provocados por el hombre o inducidos por la naturaleza; dando como resultado enfermedades mortales y/o resistentes, por lo que los medicamentos no pueden combatirlas.

Fue hasta el descubrimiento de la forma tridimensional del ADN cuando surgieron nuevas técnicas basadas en el ADN recombinante su alteración, el empalme genético, la ingeniería genética, la inmunología y la inmunofarmacología con avances en la automatización y el análisis de datos para crear una industria eficaz de alta tecnología.

A continuación se realiza un breve desglosamiento de la historia de esta disciplina (Cuadro 1).

**Cuadro 1** *Hitos de la Biotecnología*<sup>36</sup>.

FECHA	
1928-1940	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El desarrollo de los antibióticos, con ayuda de la biotecnología descubrió al <i>Penicillium</i> (<a href="#">Alexander Fleming</a>). Su trabajo condujo a la purificación del antibiótico (Howard Florey, Ernst Boris Chain y Norman Heatley).</li> </ul>
1952-1953	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En 1940, la penicilina llegó a estar disponible para uso medicinal para tratar infecciones bacterianas en los seres humanos.</li> <li>▪ Datos de difracción, de los rayos X, modelo de doble hélice propuesto para la estructura tridimensional del DNA. (JD. Watson y FH Crick.)</li> </ul>
1962-1977	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reconocimiento del sitio específico y clivaje del DNA por endonucleasas de restricción (W Arber , 1962; M Melson y R Yuan, 1968; HO Smith, 1970; D Nathans, 1971).</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Determinación del código genético (M Nirenberg, S Ochoa y P Leder, 1966; HG Khorana, 1966).</li> <li>▪ Identificación del DNA ligasa (M Gellert, 1967).</li> <li>▪ Identificación de la DNA polimerasa dirigida por el RNA (transcriptasa inversa) (HM Temin y S Mizutani; 1970; D Baltimore, 1970).</li> <li>▪ Técnicas de clonación por DNA (HW Boyer, S Cohen y P Berg 1971-1972).</li> <li>▪ Creación de un hibridoma (C Milstein y G Kohler, 1975).</li> <li>▪ Tecnologías de secuencia del DNA (F Sanger, 1977; W Gilbert, 1977).</li> </ul>
<b>1981</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aprobación en los Estados Unidos del primer equipo diagnóstico que utiliza la tecnología de MAb (anti-C3d BioClone; Ortho Diagnostics, 1981).</li> </ul>
<b>1982</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aprobación en los Estados Unidos del primer producto farmacéutico ético producido con tecnología rDNA; [Humulin (insulina humana): Genentech y Eli Lilly &amp; Co ].</li> </ul>

<p><b>1986</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El Proyecto Genoma Humano es generado por el Departamento de Energía de EE.UU. ("DOE").</li> </ul>
<p><b>1990</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Comienza el desarrollo del "Proyecto del Genoma Humano".</li> </ul>
<p><b>1996</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Existían 2841 medicamentos y vacunas obtenidos por biotecnología, que se encontraban en ensayos clínicos en humanos o esperaban la aprobación de la FDA.</li> </ul>
<p><b>2003-actualidad</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Finaliza el "Proyecto de Genoma Humano", logrando así una identificación de genes asociados a diferentes trastornos.</li> <li>▪ Se han logrado adelantos en la tecnología de secuenciación y síntesis de DNA y proteínas.</li> <li>▪ Integración del sitio específico de secuencias clonadas de DNA.</li> <li>▪ Terapia genética.</li> <li>▪ Modelado y diseño molecular computarizados de rutina.</li> </ul>

## **CAPÍTULO 2**

### **MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.**

#### ***Definiciones de Medicamento Biotecnológico.***

##### ***Nacional.***

- La Ley de General de Salud en el Artículo 222 Bis define que un medicamento biotecnológico es toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presenta en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas. Los medicamentos biotecnológicos innovadores podrán ser referencia para los medicamentos biotecnológicos no innovadores, a los cuales se les denominara incomparables.
  
- El Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) en el art. 81. define biofármaco a toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas y que reúnan las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico.

Asimismo se entiende por medicamento biotecnológico a toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

## ***Internacional.***

- Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Los productos biotecnológicos son medicamentos que han sido obtenidos a partir de cultivos de células animales y cultivos microbianos. Constituyen proteínas obtenidas por la técnica del ADN recombinante expresadas en tejidos animales o en formas de vida microbianas, incluyendo a los productos obtenidos a través de la técnica de anticuerpos monoclonales.<sup>19</sup>

## ***Clasificación de medicamento biotecnológico.***

### **➤ *Clasificación Nacional.***

Los biofármacos y los medicamentos biotecnológicos según el Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) podrán ser:

- I. Proteínas recombinantes: las proteínas producidas por cualquier ente biológico procarionte o eucarionte al que se le introduce, por técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico que las codifica;
- II. Péptidos sintéticos: Los péptidos constituidos por menos de cuarenta aminoácidos producidos por técnicas de biotecnología molecular;
- III. Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmido: Los ácidos nucleicos obtenidos de plásmidos naturales o modificados por técnicas de ingeniería genética, y
- IV. Los demás que, en su caso, determine mediante acuerdo la Secretaría, conforme a los avances técnicos y científicos.

### **➤ *Clasificación Internacional.***

#### **✘ La Agencia Europea del Medicamento (EMA).**

Los medicamentos biotecnológicos, también denominados fármacos biotecnológicos, pueden ser proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, vectores para el transporte de material genético, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos, oligonucleótidos antisentido, vacunas, etc. que comparten la característica de ser productos medicinales obtenidos a partir de técnicas de biotecnología (r-DNA, expresión génica controlada, métodos basados en anticuerpos, etc.)

**✘ La FDA los medicamentos biotecnológicos o productos biológicos.**

Productos biológicos incluyen una amplia gama de productos tales como componentes de vacunas, sangre, alergénicos, células somáticas, la terapia génica, los tejidos y proteínas recombinantes terapéuticas. Estos pueden ser compuestos de azúcares, proteínas, ácidos nucleicos; también complejas combinaciones de estas sustancias, o pueden ser entidades vivientes, como las células y los tejidos. Son aislados de una variedad de fuentes naturales humana, animal o microorganismos y puede ser producido por los métodos de la biotecnología y otras tecnologías de vanguardia. Están basados en los genes y cultivos celulares, son usados para tratar distintas patologías, de las cuales no existen tratamientos alternos. <sup>16</sup>

**✘ Organización Mundial de la Salud (OMS).**

Medicamentos obtenidos a partir de microorganismos, sangre u otros tejidos, cuyos métodos de fabricación pueden incluir uno o más de los siguientes elementos: crecimiento de cepas de microorganismos en distintos tipos de sustratos, empleo de células eucariotas, extracción de sustancias de tejidos biológicos, incluidos los humanos, animales y vegetales, productos obtenidos por ADN recombinante ó hibridomas y la propagación de microorganismos en embriones o animales, entre otros.

Las vacunas, alergenos, antígenos, hormonas, citoquinas, enzimas, derivados de sangre humana y plasma, sueros inmunes, inmunoglobulinas, anticuerpos, productos de fermentación (incluyendo los elaborados mediante tecnología recombinante) y reactivos empleados para diagnóstico “in vitro” son productos biológicos. <sup>18</sup>

## ***Características de los medicamentos biotecnológicos.***

A diferencia de los medicamentos de síntesis química tradicional, las moléculas biotecnológicas suelen ser proteínas de alto peso molecular, con un tamaño de hasta 1000 veces el de las moléculas de síntesis química. La actividad biológica de estas moléculas estará condicionada en gran medida por su estructura, por el grado y el patrón de glicosilación en el caso que se trate de una glicoproteína, y el perfil de isoformas del producto final.

Los medicamentos biotecnológicos se obtienen a partir de procesos de producción que pueden durar meses y que comprenden varias etapas complejas. Éstas van desde la definición de la secuencia de DNA que codifica la proteína deseada, pasando por el desarrollo del banco de células en el cual se producirá la expresión de esta secuencia para obtener la proteína recombinante que posteriormente será purificada y analizada adecuadamente. La complejidad de este proceso convierte a la molécula final en un producto totalmente dependiente de cada una de las etapas del proceso de fabricación, de manera que pequeños cambios (en los excipientes, uso de nuevos bancos de células etc.) podrían aportar alteraciones clínicamente significativas en términos de seguridad y eficacia del producto final. Es por este motivo, que se dice en biotecnología que “el proceso es el producto”, en referencia a la total dependencia que los biotecnológicos tienen de cada uno de los detalles de su proceso de manufactura.

La característica fundamental entre las moléculas de síntesis química y aquellas obtenidas por biotecnología es el riesgo de provocar una respuesta inmunitaria, ya que son células vivas. Y como consecuencia provocar alteraciones clínicas y no ayudar a tratar la patología,

## CAPÍTULO 3. PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

### *Procesos Biotecnológicos.*

#### *Generalidades de la Tecnología del ADN Recombinante.*

La ingeniería genética, llamada también metodología del ADN recombinante, es un conjunto de herramientas y métodos que permiten la manipulación *in vitro* del material genético de los organismos vivos (Ver Figura 1).



Figura1. El ADN. <sup>23</sup>

## ***ADN recombinante.***

La tecnología de ADN recombinante es una técnica para el aislamiento de secuencias específicas de ADN. El término ADN recombinante se refiere a la combinación de segmentos de ADN que no se encuentran unidos de manera natural y que provienen de fuentes biológicas diferentes. Esta tecnología representa una herramienta que hace posible aislar poblaciones puras de secuencias específicas de ADN a partir de una población de secuencias mezcladas. El proceso de ADN incluye:

1. Los fragmentos de ADN se generan utilizando enzimas (endonucleasas de restricción) que reconocen y cortan las moléculas de ADN por secuencias nucleotídicas específicas.
2. Los fragmentos producidos mediante digestión con enzimas de restricción se unen a otras moléculas de ADN que sirven de vectores. Los vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped y facilitan la manipulación de la molécula de ADN recombinante recién creada.
3. La molécula de ADN recombinante, formada por un vector que lleva un segmento de ADN insertado, se transfiere a una célula huésped. Dentro de esta célula, la molécula de ADN recombinante se replica, produciendo docenas de copias idénticas conocidas como clones.
4. Al replicarse las células huésped, las células descendientes heredan ADN recombinante, creándose una población de células idénticas, que llevan toda la secuencia clonada.
5. Los segmentos de ADN clonados pueden recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.
6. Potencialmente, el ADN clonado puede transcribirse, y el producto génico puede aislarse y examinarse.

## ***Enzimas de restricción.***

Son enzimas que hacen cortes específicos de secuencia en el ADN; todas las enzimas de restricción son capaces de reconocer secuencias específicas y cortas de ADN. Los sitios de reconocimiento se disponen de manera simétrica y son palíndromos, es decir muestran la misma lectura invertida en la cadena complementaria (Ver Figura 2). El sitio de restricción puede dar extremos romos o cohesivos (Ver Figura 3). Después del reconocimiento se realiza el corte, que puede ocurrir cerca o justo en sitio de reconocimiento según sea la enzima de restricción.

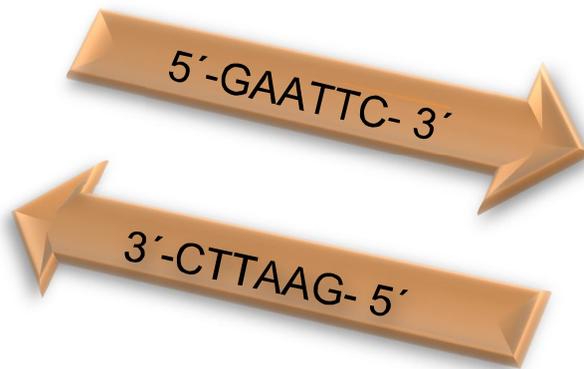


Figura 2. Secuencia palindrómica.<sup>34</sup>

Secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI*.

Existen tres tipos de enzimas de restricción:

- **Tipo I** Estas enzimas cortan las dos cadenas del ADN en una posición aleatoria a cierta distancia del sitio de restricción. No se utilizan normalmente en la investigación de DNA recombinante ya que el sitio de corte no es preciso.

- **Tipo II** Estas enzimas reconocen una secuencia específica y cortan las dos cadenas de la molécula de DNA con absoluta precisión dentro de la secuencia reconocida. Se usan ampliamente en investigación de DNA recombinante puesto que cortan en sitios específicos.
- **Tipo III** Las enzimas de tipo III cortan a cierta distancia de la secuencia de reconocimiento, antes o después de la secuencia que reconocen.

### Enzimas de restricción

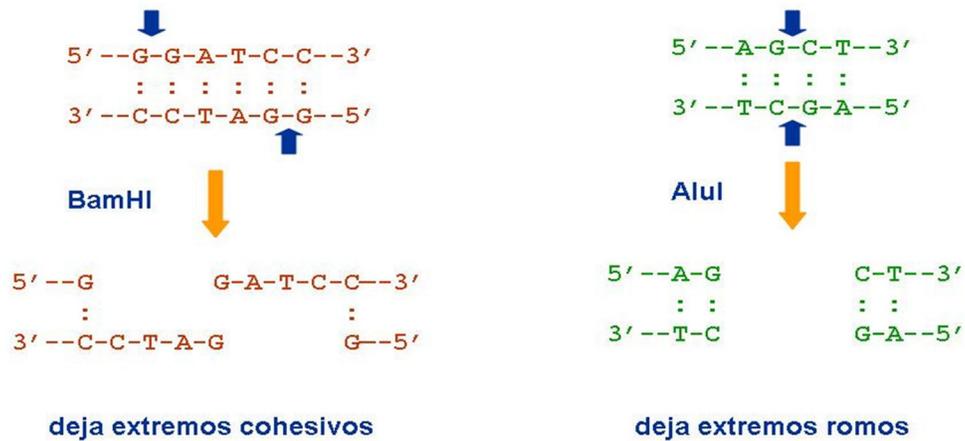


Figura 3. Enzimas de restricción.<sup>3</sup>  
 Los diferentes cortes que realizan las enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción se denominan según el organismo en el que se descubrieron. Ejemplo la enzima EcoRI proviene de *Escherichia coli* (Ver Cuadro 2).

**Cuadro 2. Enzimas de restricción.**

Enzima	Fuente	Sitio de corte
<b>Alu I</b>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT
<b>Hae III</b>	<i>Haemophilus aegyptus</i>	GGCC
<b>Mn II</b>	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	CCTC
<b>EcoRI</b>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC

La enzima EcoRI corta las cadenas de ADN de manera escalonada dentro del sitio de reconocimiento, dejando extremos de cadena sencilla (Ver Figura 4). Estas colas, que tienen secuencias nucleotídicas idénticas, son cohesivas, ya que pueden unirse a colas complementarias de otros fragmentos de DNA mediante puentes de hidrógeno.

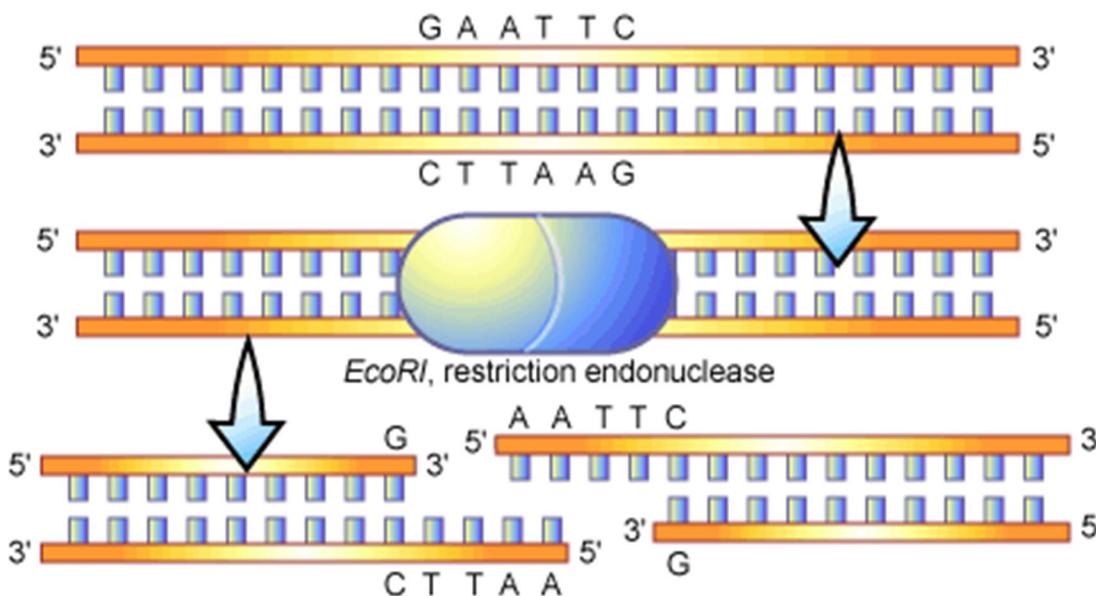


Figura 4. Enzima de restricción *Eco RI*.<sup>24</sup>

## Vectores.

Un vector es una molécula de ADN utilizado como vehículo para la transferencia de material genético extraño en otra célula. Para que una molécula de ADN sirva como vector, debe:

1. Replicarse junto con el segmento de ADN que transporta.
2. Tener sitios de corte para las enzimas de restricción. Estos sitios una vez tratados con la enzima de restricción, son utilizados para insertar segmentos de DNA
3. Tener algún marcador de selección, es decir algún gen de resistencia a antibiótico o algún gen que la célula huésped no posea.
4. Ser de fácil recuperación.

Estos vectores pueden ser: plásmidos, fagos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC). Ver figura 5.

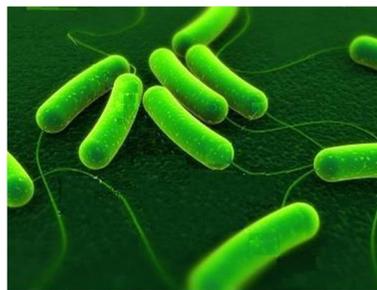
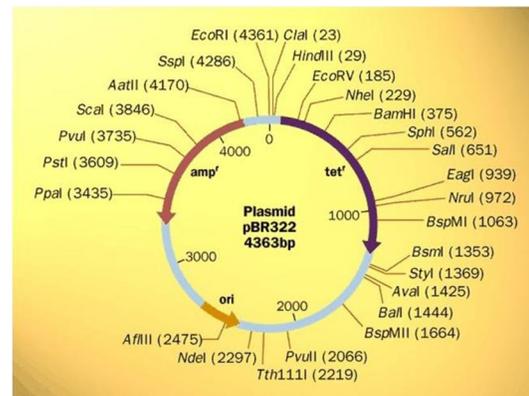
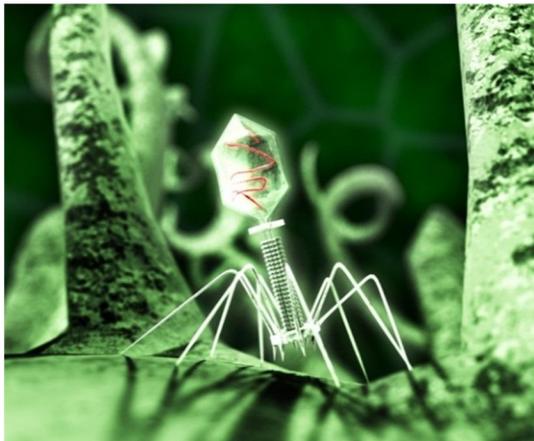


Figura 5. Vectores.<sup>59, 60, 61</sup>

## ***Plásmidos.***

**Los plásmidos** son vectores de doble cadena de ADN, por lo general tienen forma circular. Este tipo de vector posee un origen de replicación llamado *ori*, es capaz de replicarse en forma independiente; es decir no necesita de los mecanismos de replicación de la célula huésped y su principal función es conferir resistencia contra los antibióticos. Para transmitir un plásmido a una bacteria a partir de otra bacteria existen los siguientes mecanismos: transformación, transducción y conjugación.

- ④ **Transformación.** El ADN bacteriano entra a otra célula bacteriana.
- ④ **Transducción.** Un virus bacteriano infecta a una bacteria, toma el ADN del cromosoma e infecta a otra.
- ④ **Conjugación.** Transferencia de ADN bacteriano, donde el genoma del plásmido con o sin parte del cromosoma bacteriano es transferido a otra célula, donde el contacto celular es dispensable para efectuar la transferencia del material genético. Existen dos grupos: plásmidos conjugados y no conjugados; los conjugados poseen la habilidad de tener un promotor sexual para la conjugación entre células bacterianas (Ver Figura 6) y los no conjugados no lo poseen. El proceso de transferencia y conjugación de un plásmido es controlado por los genes; ***tra*** por lo tanto, solo aquellos que poseen estos genes pueden transmitir material genético por conjugación.

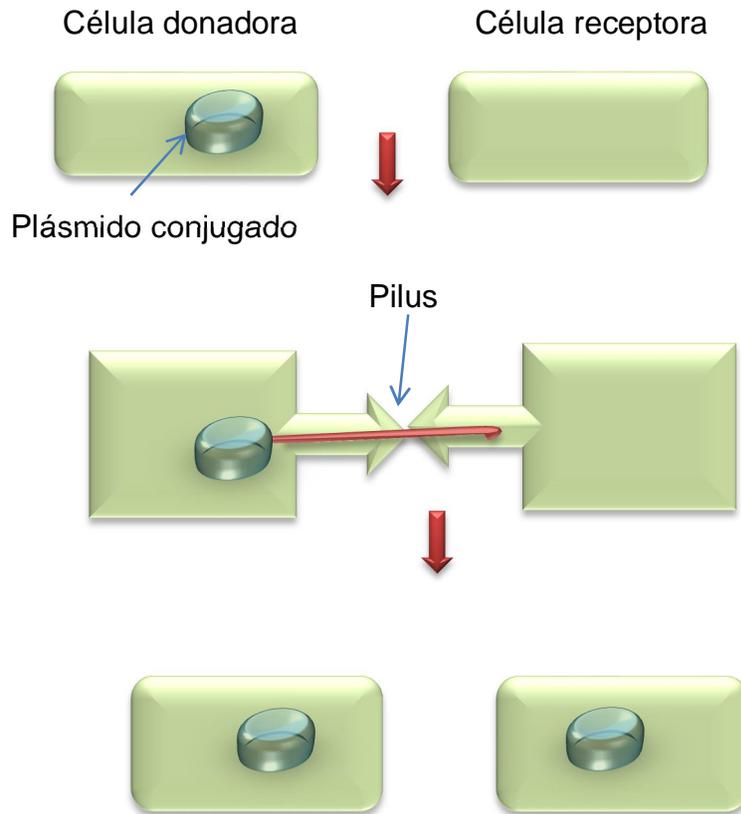


Figura 6. Transferencia de un plásmido por conjugación.<sup>37</sup>

Una copia de un plásmido es transferido a la célula receptora, a través del pilus.

*Clasificación con base a las características de los genes:*

- **Plásmidos F** confieren a la célula bacteriana la capacidad de conjugarse con otra célula que no lo posea. Los genes que posee son necesarios, para la construcción del pili sexual o pili F. Este pili F es necesario para la transferencia de material genético entre células, esta transferencia da inicio en un sitio denominado *ori T*.
- **Plásmido R** contiene ciertos genes que le confieren resistencia a la célula contra uno o más agentes antimicrobianos, como el cloranfenicol, ampicilina y mercurio. Estos plásmidos son muy importantes en microbiología clínica, estos se expanden entre la población causando severas infecciones bacterianas; por ejemplo es el RP4, que se encuentra en *Pseudomonas* o en otras bacterias.
- **Plásmido Col** codifica para colisinas (proteínas con capacidad de destruir a otra bacteria), ejemplo ColE1 de *E. coli*.
- **Plásmidos degradativos** algunas bacterias son capaces de metabolizar moléculas poco usuales como el tolueno y ácido salicílico, por ejemplo **TOL** de *Pseudomonas putida*.
- **Plásmidos virulentos** confieren patogenicidad en las células bacterianas blanco, están incluidos los plásmidos **Ti** de *Agrobacterium tumefaciens*.

El plásmido pBR322 fue uno de los primeros plásmidos que se utilizó en ADN recombinante, ya que contiene genes de resistencia a la ampicilina y tetraciclina. (Ver Figura 7).

En una célula bacteriana que no posea genes contra los antibióticos ampicilina y tetraciclina; se introduce el plásmido pBR322 y adquiere así resistencia a estos antibióticos.

Sin embargo si solo se inserta un fragmento de ADN en los sitios de restricción **PvuI** o **PstI** entonces, se inactivará el gen de ampicilina, pero el de tetraciclina seguirá activo; es decir la bacteria será resistente a la tetraciclina pero sensible a ampicilina.



Debido al gran avance de la tecnología se han desarrollado vectores más sofisticados con distintas características. Entre ellos están los pUC18/PpUC19 (Ver Figura 8); que son plásmidos derivados del pBR322. Posee la mitad del tamaño, inserta fragmentos de ADN más largos, contiene el gen de resistencia a la ampicilina y posee la parte inicial del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Tiene una región llamada sitio de clonación múltiple llamada *polylinker*, donde se localizan muchos sitios de restricción que están agrupados y donde se encuentra el gen **Lac Z** que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, de manera que las bacterias que reciben el gen forman colonias azules en un medio que contiene  $\beta$ -galactosidasa.

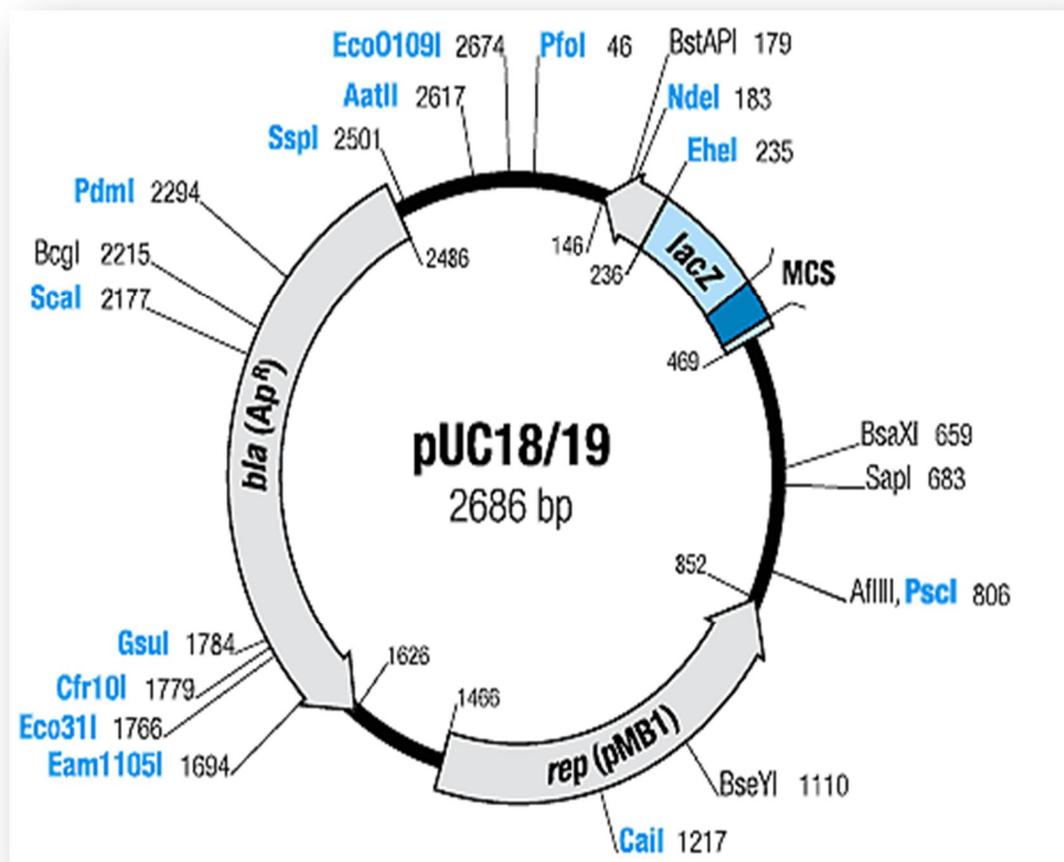


Figura 8. Mapa genético del plásmido pUC18/19.<sup>24</sup>

Se observa el gen **Lac** donde se encuentra el sitio de clonación múltiple.

## **Bacteriófagos**

Un bacteriófago o también conocido como fago, es un virus que infecta solo a bacterias, ya que introducen su ADN en ellas. Estos vectores están compuestos por una cabeza o cápside que está hecha de proteínas, en donde se encuentra al material genético ADN o ARN. El material genético puede ser de una o de doble cadena y circular o lineal.

Hay tres tipos de estructuras de la cápside de bacteriófago: icosaédrica, filamentosa o helicoidal. La cola es una vaina que se contrae para inyectar el contenido de la cabeza y las fibras de la cola son para agarrarse de la paredes celulares (Ver Figura 9 y 11).

Los fagos carecen de cualquier mecanismo de reproducción y lo realizan mediante los mecanismos de la bacteria para replicarse. Este puede desarrollarse en dos maneras: la primera es destruir a la bacteria conocido como **ciclo lítico** y la segunda de formar parte de la bacteria conocido como **ciclo lisogénico**.

### ***Ciclo lítico.***

El bacteriófago se coloca en la pared celular de la bacteria mediante receptores específicos y perfora la membrana, formando un orificio donde el virus inserta su material genético en la bacteria, a través de la cola del fago. Se introduce en el cromosoma bacteriano, así el virus replica y expresa sus genes en lugar de la bacteria. Se reproducen en gran cantidad, hasta que la célula es lisisada y sale el material virulento, donde infecta a otras células (Ver Figura 10).

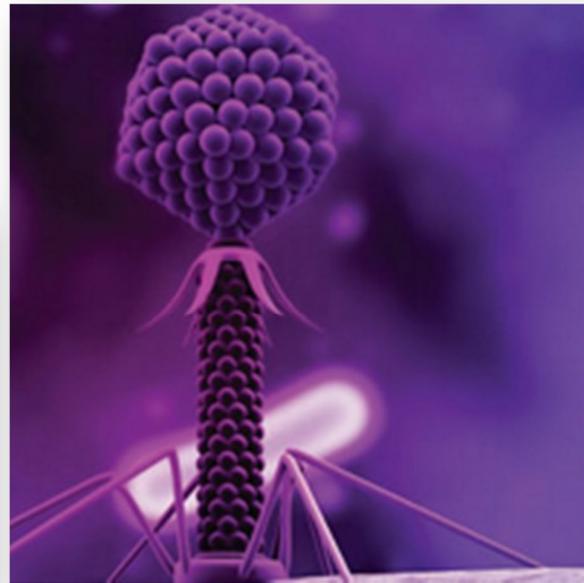
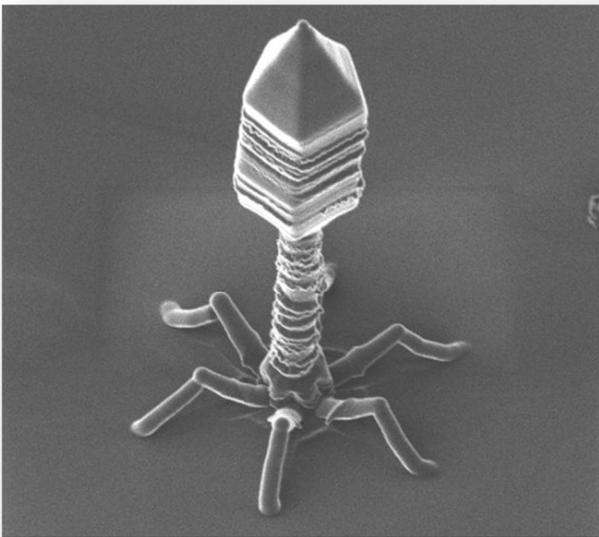
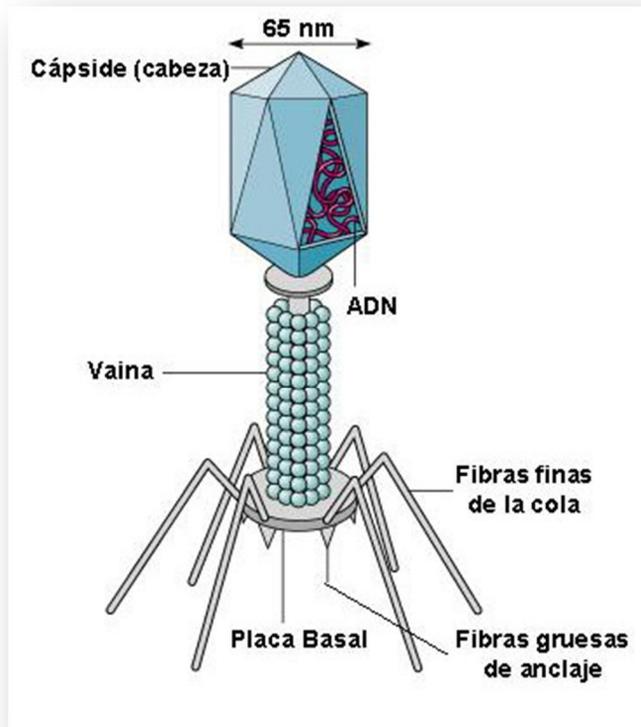


Figura 9. Estructura y Microscopía de barrido de un bacteriófago.<sup>26-27</sup>

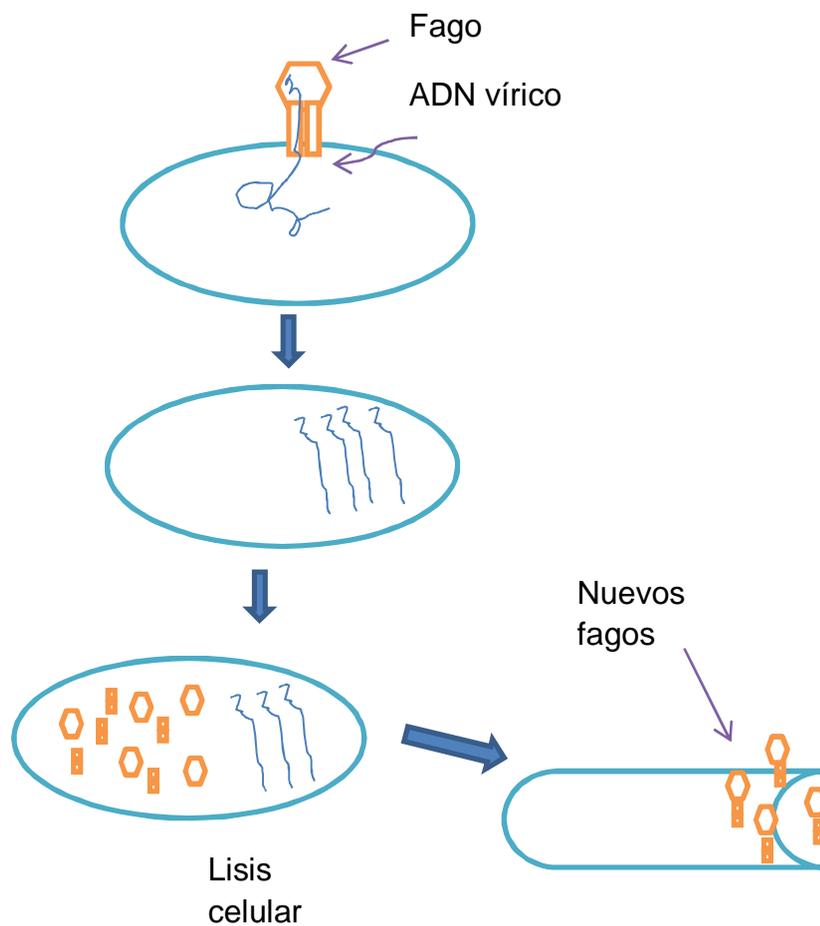


Figura 10. Ciclo lítico.<sup>37</sup>

Se inserta el material genético del fago en la célula bacteriana, posteriormente la molécula de ADN fágico se replica. Finalmente los componentes de la cápside son sintetizadas la nuevas partículas víricas y ensambladas para su liberación.

### **Ciclo lisogénico.**

El fago es insertado dentro del genoma bacteriano; se le llama profago una vez integrado en el genoma. El profago físicamente no se distingue de una célula no infectada. La célula se reproduce junto con el ADN viral. El profago es liberado eventualmente del genoma de la célula y el fago regresa al ciclo lítico y lisa a la célula (Ver figura 12).

Los fagos que no destruyen en todo a la bacteria que infectan, se conocen como fagos temperados. Uno de ese tipo es el fago lambda ( $\lambda$ ), un vector muy utilizado, ya que se conoce la secuencia y los genes que codifica. A partir del fago lambda se han diseñado muchos otros.

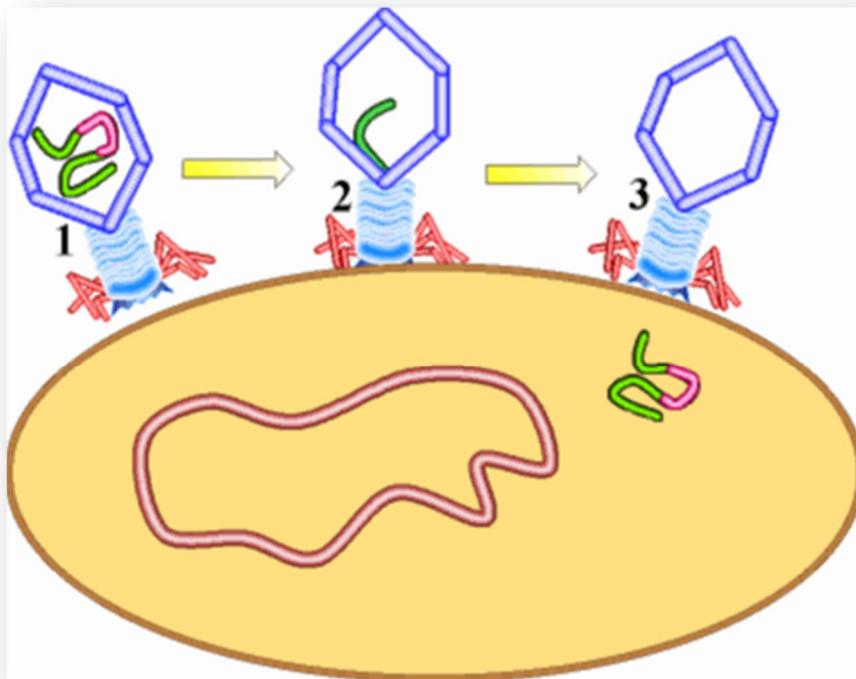


Figura 11. Inserción de ADN fágico.<sup>25</sup>

Un bacteriófago introduce su material genético en una célula bacteriana.

Otro vector utilizado es el fago M13 es un fago de cadena sencilla tiene una cápside filamentosa donde se encuentra la molécula de ADN, al replicarse produce una molécula de doble cadena denominada forma replicativa (RF). Las moléculas RF pueden insertar ADN exógeno en sitios de restricción únicos presentes en el DNA del fago. Cuando se reinsertan en células bacterianas, las moléculas RF se replican y producen cadenas sencillas, en las que hay una cadena del DNA insertado. La célula hace salir los clones de DNA de cadena sencilla que produce M13, que pueden recuperarse y utilizarse directamente para su secuenciación, o como molde para alteraciones mutacionales de la secuencia clonada.

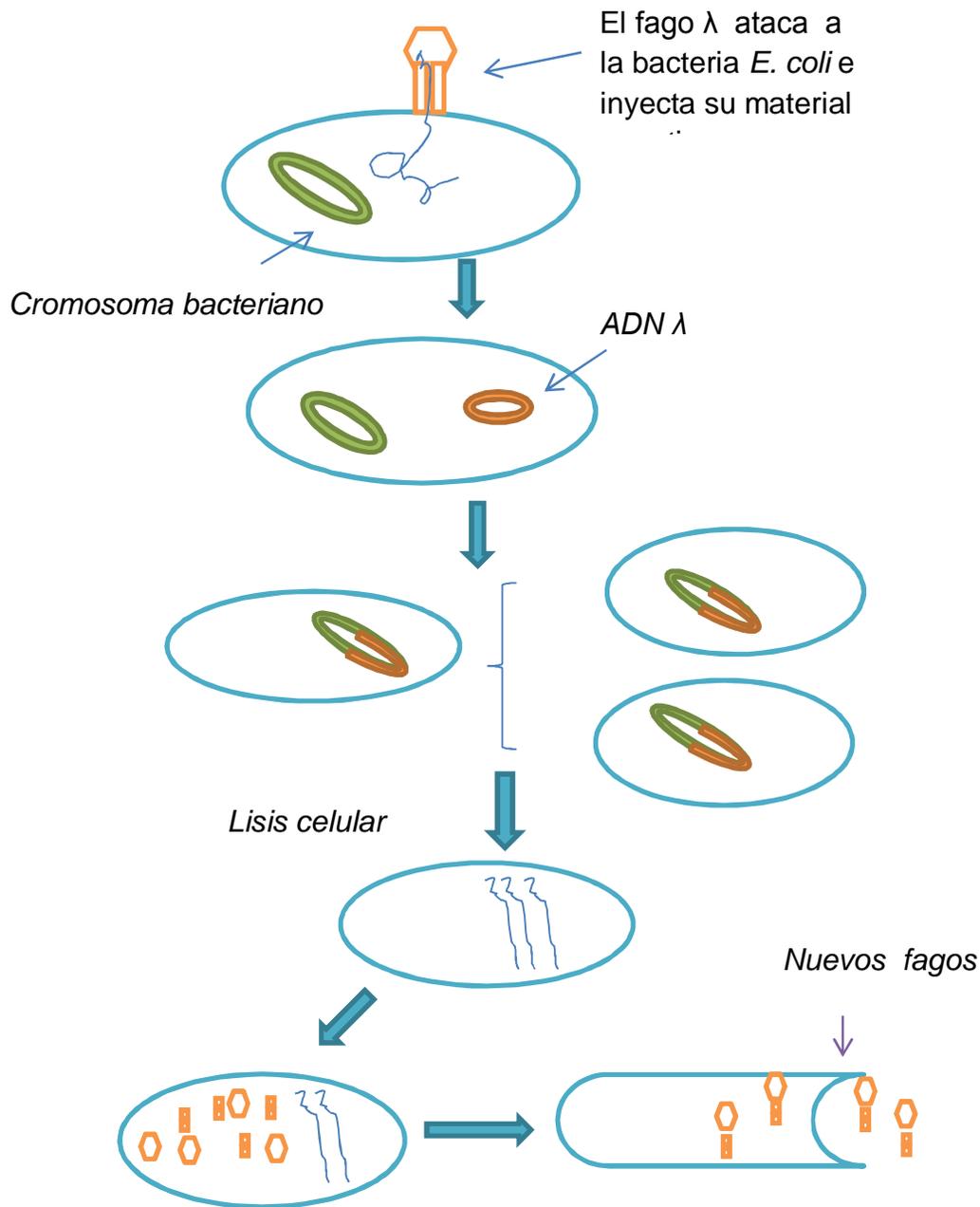


Figura 12. Ciclo lisogénico.<sup>37</sup>

El fago  $\lambda$  inyecta su material genético, se integra el ácido nucleico viral. El profago toma el control del metabolismo bacteriano y comienza a producir ARNm viral.

Hay producción de proteínas virales de la cápside y combinación con el genoma viral. Se prosigue con el autoensamblado de la cápside, hay lisis celular y se liberan las nuevas partículas virales.

## Cósmidos.

Son vectores híbridos que resultan de la combinación de plásmidos y fagos, contiene la secuencia **cos** del fago lambda (requerida para empacar el ADN); posee secuencias de replicación del plásmido y genes de resistencia a antibióticos. Una vez que el cósmido entra en la célula este se replica como un plásmido.

El pJB8 es un vector pequeño que contiene un origen de replicación bacteriano (**ori**), un sitio **cos** y un gen de resistencia a ampicilina. El sitio **cos** permite que el vector contenga un inserto grande, este se empaquete con proteínas de cubierta vírica como si fuera cromosoma. Y está cubierta vírica permite infectar células huéspedes (Ver Figura 13).

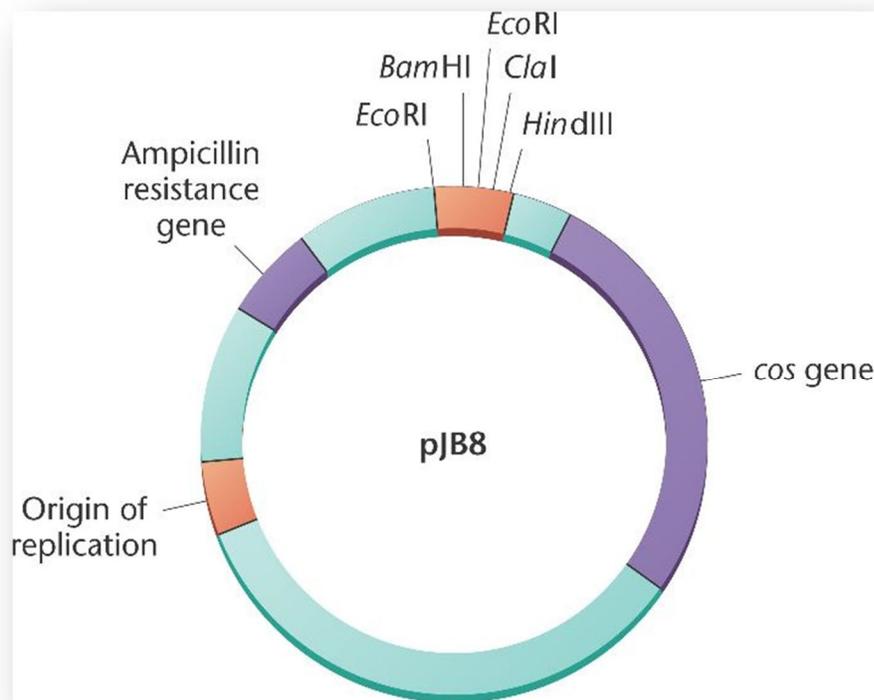


Figura 13. Cósmido pJB8.<sup>28</sup>

## **Cromosomas bacterianos artificiales.**

Los cromosomas artificiales bacterianos (BAC) son vectores, que poseen genes de replicación, también algunos sitios de restricción para insertar ADN exógeno, un factor F y un marcador de resistencia al antibiótico. El factor F es el responsable de la transferencia genética durante la conjugación bacteriana y este tipo de vector es utilizado para analizar genomas eucarióticos.

## **Cromosomas artificiales de levadura.**

La levadura es un organismo eucariótico, puede manipularse y crecer de manera semejante a las células bacterianas. Estos vectores conocidos como YAC (yeast artificial chromosomes), permiten la inserción de fragmentos de ADN foráneo en el genoma de la levadura. El ADN clonado se propaga entonces como si fuera simplemente otro cromosoma en la célula de la levadura. La gran capacidad de almacenamiento que presentan estos vectores los han convertido en una herramienta importante en la tecnología de ADN recombinante. Estos vectores se han empleado para almacenar y clonar genes humanos completos, ejemplo el gen de la fibrosis quística.

## Construcción de Bibliotecas de ADN.

La colección de fragmentos de ADN clonado se le denomina Biblioteca de ADN o Genoteca genómica. Estas bibliotecas pueden provenir del genoma completo de un individuo, del DNA de un solo cromosoma, o de un conjunto de genes. [Existen tres tipos de bibliotecas: genómicas, cromosómicas y de ADNc.](#) La finalidad de la construcción de estas bibliotecas es para recuperar cualquier gen de un individuo.

### **a. Genotecas genómicas.**

Las genotecas son construidas utilizando vectores fágicos. Para elaborar una biblioteca genómica es necesario cortar el ADN del fago con enzimas de restricción, se purifican los fragmentos obtenidos; se pueden ver mediante una electroforesis en gel y finalmente se unen los brazos del fago con una ADN ligasa. En este tipo de bibliotecas se pueden encontrar todos los genes de un organismo, contiene una copia de todas las secuencias.

### **b. Bibliotecas cromosómicas.**

Una biblioteca construida a partir de una fracción subgenómica, es muy valiosa para seleccionar genes específicos y para examinar la organización de un cromosoma. Este tipo de bibliotecas provienen de cromosomas individuales humanos y se han preparado utilizando la citometría de flujo.

### **c. Bibliotecas de ADNc.**

Este tipo de bibliotecas son construidas a partir de RNAm, por la transcriptasa inversa. Representan sólo un subconjunto de todos los genes del genoma, no contiene secuencias promotoras adyacentes al gen y tampoco contiene intrones. Si hay interés de un gen específico, se puede construir una biblioteca a partir de un tejido en el que se expresa el gen. (Ver Figura 14).

Las bibliotecas que expresan ADNc se utilizan desde hace algunos años para identificar antígenos o moléculas que interaccionan con una segunda molécula, la cual a su vez, se utiliza como sonda.

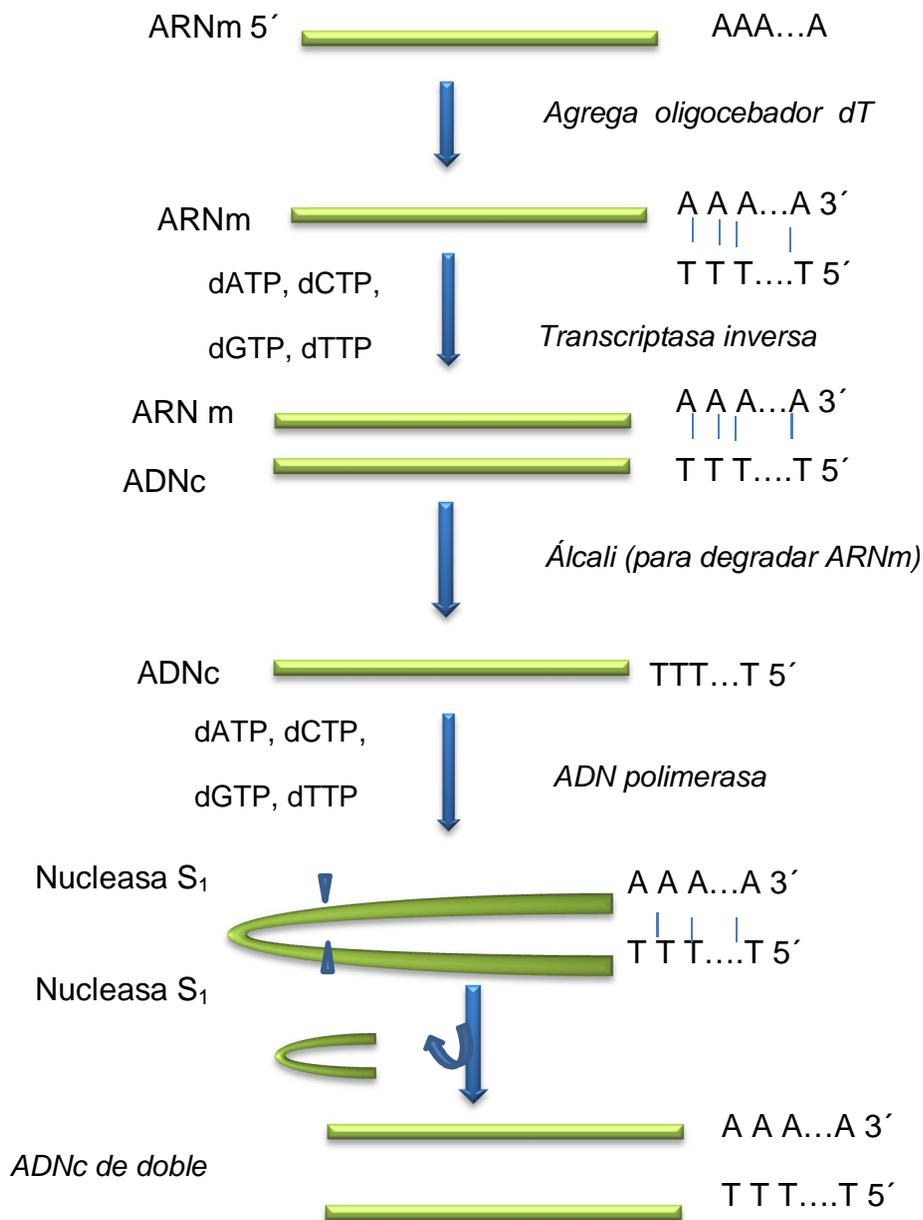


Figura 14. Biblioteca de ADNc Síntesis de ADNc a partir de RNAm con *transcriptasa inversa*.<sup>34</sup>

El ARNm de los reticulocitos son moléculas que codifican las cadenas globina alfa y globina beta de la hemoglobina. Este ARNm puede usarse como molde para hacer una molécula de ADN complementario de doble cadena (ADNc) con la enzima transcriptasa inversa. El ADNc es una copia de doble cadena del ARNm.

## ***Identificación de secuencias clonadas.***

Dentro de una biblioteca existe miles de clones, para identificar o localizar una secuencia específica de ADN se puede lograr de distintas maneras una de ellas es usando el marcaje. Se requiere el uso de marcadores para localizar el gen específico.

## ***Marcadores moleculares.***

Para marcar o localizar un gen en particular es necesario el uso de marcadores moleculares. Estos marcadores son biomoléculas, que permiten detectar variaciones. Los cambios en una secuencia del ADN son conocidos como polimorfismo. Los marcadores pueden ser de dos tipos proteínas (antígenos o isoenzimas) o ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia).

Marcadores de proteínas, son usadas para detectar polimorfismo debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica y estas varían en distintas maneras.

- ✘ Isoenzimas: Se definen como diferentes formas moleculares de un tipo de enzima, que poseen una actividad catalítica común, es decir actúan sobre el mismo sustrato. Ciertos cambios en la secuencia de ADN, que codifica para estas enzimas pueden resultar en cambios en la composición de aminoácidos. Si estos cambios se producen, las proteínas podrían tener la misma actividad biológica, pero como su composición de aminoácidos varía, podrían tener diferente carga neta y por tanto diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico. Estas diferencias determinan patrones característicos de migración electroforética de las formas iso-enzimáticas.

Los marcadores moleculares de ADN o marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear; tienen estabilidad en la identificación de especies y variedades. A continuación se describen los tipos de marcadores de ADN:

- ✘ La sustitución, ganancia o pérdida de una base puede generar la adición o pérdida de un sitio de corte de una enzima en particular, debido a esto se induce cambios en la longitud de los fragmentos obtenidos. A estas variaciones se le conocen como polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), son secuencias de nucleótidos en el ADN y se usan como marcadores. Estas secuencias se basan en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular. La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce fragmentos para una molécula de ADN. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon, este método es conocido como Southern Blot.
  
- ✘ Las secuencias de ADN de minisatélites (*VNTR*) son secuencias repetidas que se presentan en eucariontes, se encuentran en secuencias repetidas y dispersas a través del genoma. Cada *VNTR* tiene diferente número de repeticiones, las cuales son variables y de esta manera se pueden asociar a cada alelo de distinto tamaño. Existen dos formas de detectar los *VNTR* ya sea por hibridación o por técnicas de PCR.
  
- ✘ Los microsatélites (*SSR*) son secuencias de nucleótidos que se repiten en serie, están dispersadas en el genoma y son diseñadas para complementar las secuencias vecinas. El polimorfismo de estas regiones está dado por los diferentes números de repeticiones, dando fragmentos amplificados por PCR de distinto tamaño.

- ✘ Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, conocidos como AFLP (Amplified fragment length polymorphis); son marcadores que están basados en amplificar de forma selectiva fragmentos de ADN cortados mediante enzimas de restricción. La amplificación se realiza mediante la técnica de PCR.

### **Sondas.**

Existen procedimientos en los que son requeridos el uso de sondas para rastrear una biblioteca de ADN y así encontrar la secuencia de interés. Este método se usa para identificar péptidos en la secuencia de aminoácidos de una proteína.

Las sondas son polinucleótidos que contienen una secuencia de bases complementarias a la secuencia de interés. Estas sondas pueden marcarse con métodos radioactivos, no radioactivos o mediante reacciones colorimétricas que indiquen la localización de una o varias clonas específicas. Su procedencia varía, ya que pueden venir de genes aislados de otras especies. Un ejemplo es el aislamiento de genes ribosómicos de la rana *Xenopus laevis*, estos genes se marcaron con radioisótopos y se utilizaron como sonda para aislar genes ribosómicos humanos de una genoteca.

Otra técnica para generar sondas se llama Genérica reversa, es cuando se dispone de un producto proteico del gen de interés, así se conoce la secuencia completa de aminoácidos y a partir de esta secuencia se puede deducir la secuencia nucleótida que lo codifica.

## ***Rastreo de una biblioteca.***

El rastreo de una biblioteca tiene como finalidad recuperar un gen clonado. Existen diferentes técnicas:

### **✘ Hibridación de calvas.**

Esta técnica es usada cuando una biblioteca es construida a partir de fagos. Se siembra una pequeña cantidad de la solución del fago que lleva el inserto de ADN, en una placa con medio de cultivo, el fago se replica en el medio formando calvas. Estas calvas son manchas de color claro, se les llama así, ya que son más pequeñas que las colonias bacterianas. Se coloca un filtro en la superficie de la placa, para trasladar las calvas y posteriormente lisarlas. Una vez que se desnaturaliza el ADN en cadena sencilla, se usa una sonda para rastrear la secuencia.

### **✘ Paseo cromosómico o caminata cromosómica.**

Existen casos en que se puede clonar un gen en base a la clonación previa de sus secuencias vecinas. La técnica de paseo cromosómico se utiliza con el fin de recuperar clonas que están sobrepuestas dentro de una biblioteca de ADN. Primero la parte final de una secuencia de ADN ya clonada se vuelve a clonar y es utilizada como sonda para recuperar clones sobrepuestos (Ver Figura 15). Se analizan en mapas de restricción, para identificar su extensión y localizar los sitios donde están las clonas sobrepuestas y así localizar el gen de interés.

Finalmente usando técnicas de secuenciación se busca el gen y el marco de lectura abierta (nucleótidos). Este marco tiene un codón de inicio, el cual da inicio a la transcripción, seguido de una secuencia nucleotídica codificadora de aminoácidos y termina con un codón terminal. Esta técnica se ha aplicado para el reconocimiento de enfermedades genéticas.

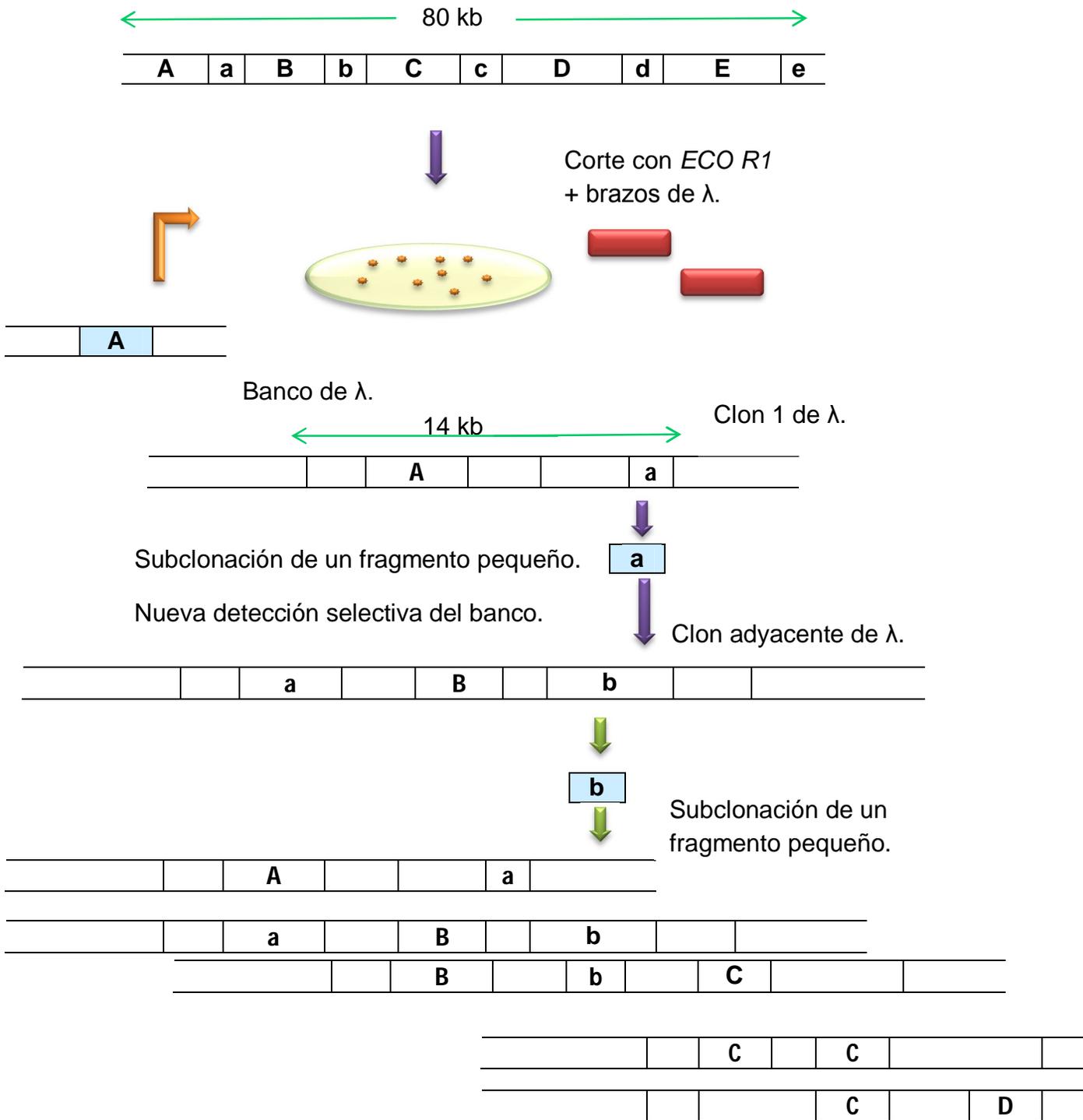


Figura 15. Paseo cromosómico.<sup>33</sup>

Un fago recombinante es recuperado de un banco celular. Se realizó digestión parcial del genoma eucariótico con *Eco R1*, se usa para aislar otro fago recombinante que contiene un segmento vecino de ADN eucariótico.

## ***Secuenciación del ADN.***

El desarrollo de técnicas que permiten conocer la secuencia exacta de un nucleótido o más en un gen clonado ha sido uno de los mayores avances de la biología molecular. Estas técnicas son esenciales para detectar variaciones en una secuencia, como mutaciones puntuales, deleciones, etc. Los procesos de secuenciación del ADN han facilitado el conocimiento de los mecanismos de función, regulación y estructura génica.

Existen dos métodos específicos para determinar la secuencia de nucleótidos de cualquier fragmento de ADN purificado: el método químico y el enzimático.

- ④ **Método químico.** En este método la secuenciación es mediante la hidrólisis con agentes químicos. Un agente químico usado comúnmente en este tipo de técnica es el didesoxi de nucleótidos (ddNTP), su función es interrumpir la acción de la ADN polimerasa en sentido 5' - 3' y así generar fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Para identificar las secuencias generadas, estas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida.

La secuenciación de moléculas de ADN identifica mutaciones precisas que alteran las funciones génicas y así es posible conocer la organización del ADN.

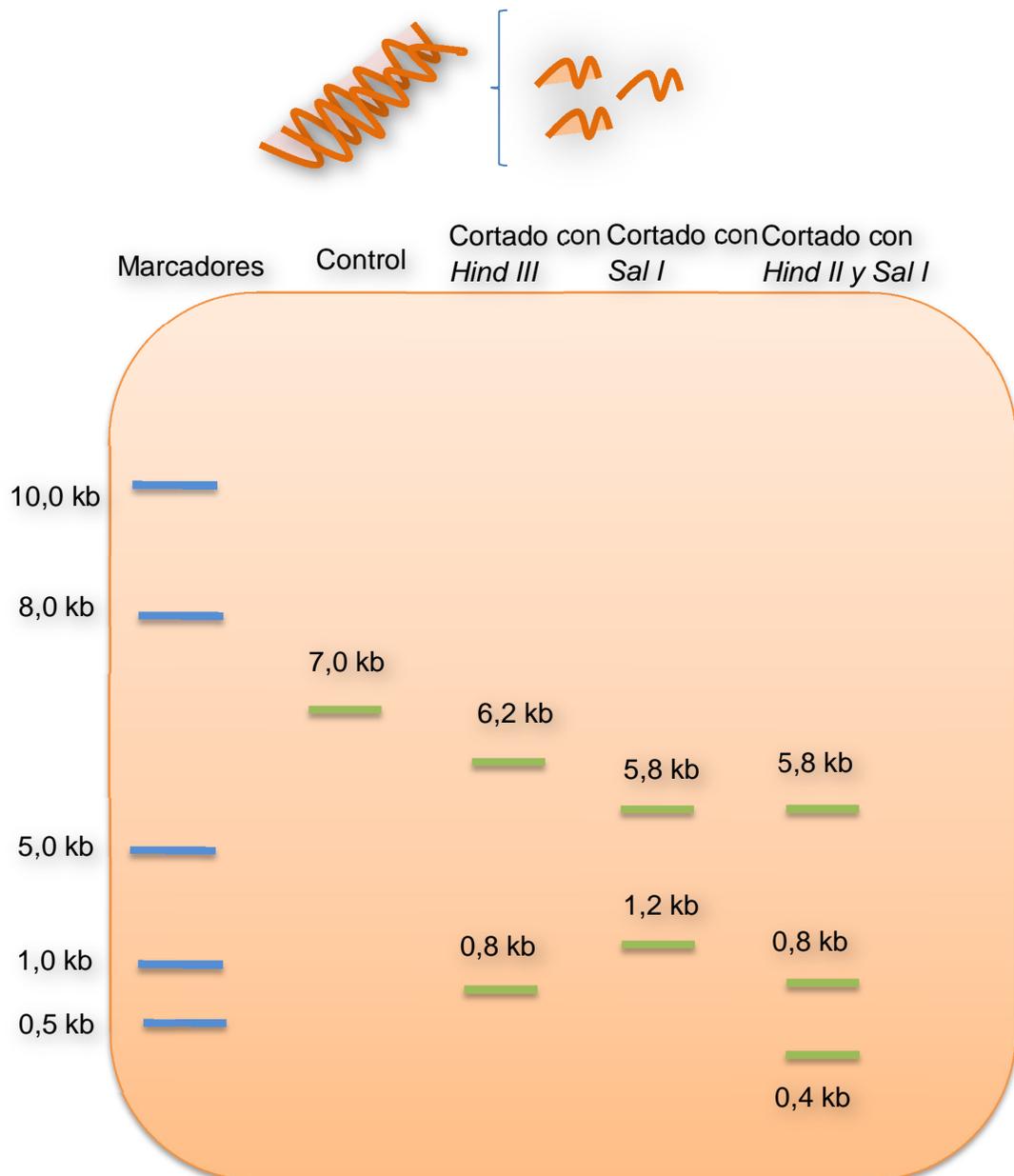
- ④ **Método enzimático.** La secuenciación por este método, es usando el ADN como molde de la ADN polimerasa para obtener una serie de réplicas parciales, que comienzan en el mismo sitio pero que terminan en diferentes puntos a lo largo de la cadena de ADN. Se basa en la utilización de didesoxirribonucleótidos trifosfatados que, al carecer del grupo oxidrilo en el extremo 3', impiden el agregado de más nucleótidos a la cadena de ADN en formación. Esta reacción genera, una escalera de fragmentos que pueden ser separados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

## Mapas de restricción.

El cortar un segmento de ADN clonado con enzimas de restricción, da como resultado fragmentos de diferentes tamaños, al número de fragmentos obtenidos, el orden y la distancia entre los sitios de corte; se conoce como cartografía o mapa de restricción.

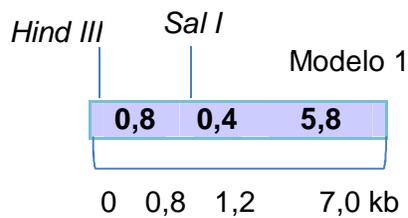
Estos fragmentos son separados por electroforesis en gel y se logran visualizar en forma de bandas, cuando son teñidos con un colorante.

Estos mapas son usados para analizar e identificar sitios de mutación que se localizan en los genes (Ver Figura 16).

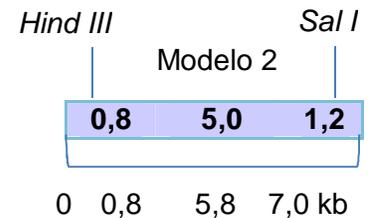




<i>Control</i>	<i>Hind III</i>	<i>Sal I</i>	<i>Hind III + Sal I</i>
7,0 kb	6,2 kb	5,8 kb	5,8 kb
	0,8 kb	1,2 kb	0,8 kb
			0,4 kb



Fragmentos predichos para la digestión con *Hind III* y con *Sal I*: 0,4 kb, 0,8 kb y 5,8 kb.



Fragmentos predichos para la digestión con *Hind III* y con *Sal I*: 0,8 kb, 1,28 kb y 5,0 kb.

Figura 16. Construcción de mapas de restricción.<sup>51</sup>

Se cortan los fragmentos de ADN clonados con enzimas de restricción. Se separan los fragmentos mediante electroforesis en gel. Finalmente se comparan los resultados de la digestión con otras enzimas para verificar los resultados. Se determina que el modelo 1 es el correcto.

Los dos modelos se construyen con base en los datos de las digestiones de las dos enzimas. Estos modelos son útiles en la predicción del tamaño de fragmentos generados durante la digestión.

## TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN.

### **Electroforesis.**

La principal función de la técnica de electroforesis es separar moléculas, proteínas, coloides u otras partículas según su tamaño y carga eléctrica. Estas moléculas o partículas se colocan en una suspensión de electrolitos y para separarlas se usa una corriente eléctrica.

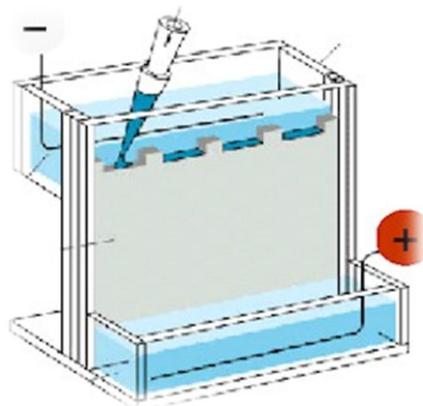
Los métodos electroforéticos son:

- ✗ Electroforesis frente móvil
- ✗ Electroforesis de zona

Electroforesis frente móvil. En una celda en forma de U, se coloca la muestra con solución amortiguadora, se pasa una corriente eléctrica y las proteínas forman una serie de capas decrecientes.

Electroforesis de zona. La muestra se coloca en una columna, placa o película de solución amortiguadora, se aplica corriente eléctrica para separar los componentes de la muestra, esta se realiza por zonas (la migración de los componentes es total). Para evitar que los componentes se vuelvan a mezclar se estabiliza el electrolito en una matriz porosa, existen varios materiales para la matriz porosa como papel, sólido en polvo o un gel de almidón, agar o poliacrilamida. La electroforesis de zona es la más utilizadas por su alta aplicación en diferentes campos, ya que pueden lograr la separación de mezclas complejas (Ver figura 17).

Figura 17. Electroforesis de zona. <sup>62</sup>



## Electroforesis en Gel

La electroforesis en gel es un método utilizado para separar, identificar y purificar segmentos de ADN, puede ser en gel de poliacrilamida o en gel de agarosa. El equipo consta de un gel transparente, el cual tiene unos pocillos para colocar la muestra. El gel es colocado en una placa metálica con solución tampón y conectada con electrodos (Ver Figura 18).

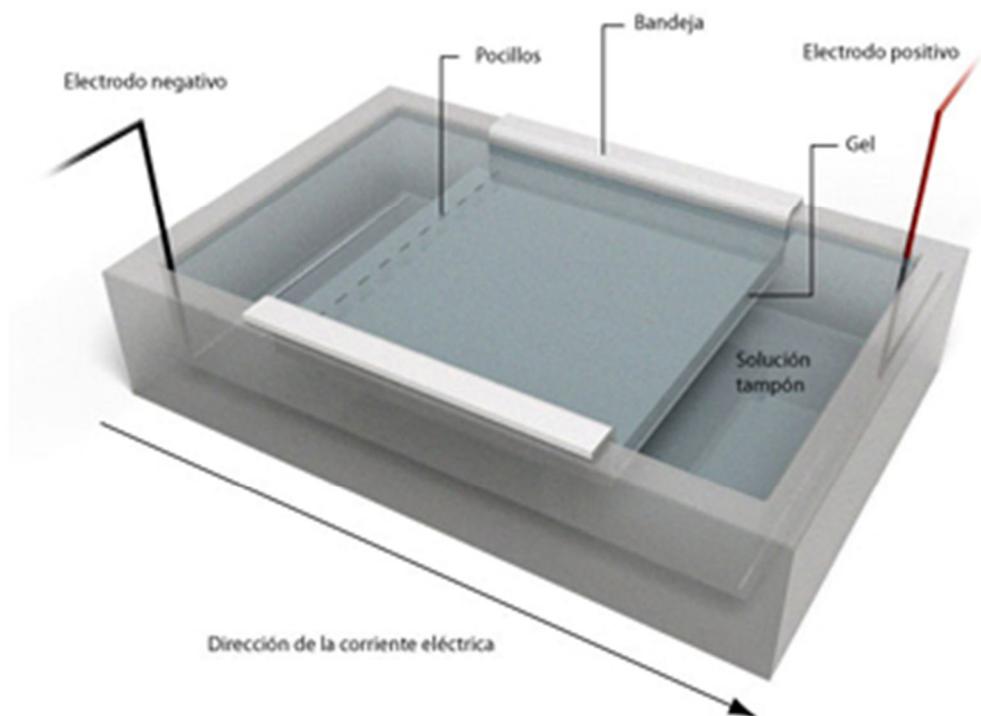


Figura 18. Esquema de un sistema de electroforesis en gel.<sup>67</sup>

## **Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE.**

La electroforesis en poliacrilamida conocida en inglés como PAGE (polyacrilamide gel electrophoresis) es una de las técnicas más usadas para separar proteínas. Este tipo de electroforesis puede llevarse sin agentes desnaturizantes o con agentes desnaturizantes.

El gel de poliacrilamida es un gel transparente, químicamente inerte, insoluble en agua, no iónico, es estable en un amplio rango de pH y se puede preparar de forma rápida y reproducible. Este gel se forma por la polimerización de la acrilamida debido a un agente entrecruzador la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador (persulfato amónico). Debido a que es transparente permite una buena visualización de las bandas, el tamaño del poro se logra al modificar la concentración de polímero (Ver Figura 19).

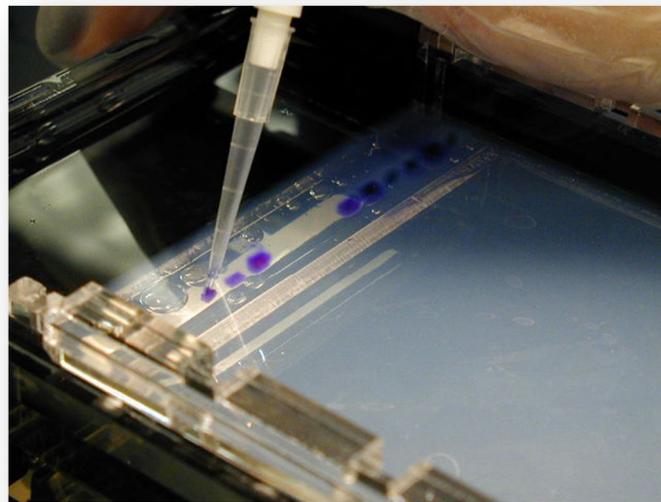
La electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), utiliza agentes desnaturizantes de proteínas. La proteína se desnaturiza mediante la adición de dodecilsulfato sódico (SDS). El SDS es un agente reductor que rompen enlaces disulfuros, separando a la proteína de su sub-unidades y dando carga negativa, así las proteínas migran a través del gel en relación directo a su tamaño. Otros agentes desnaturizantes como el 2-mercaptoetanol, que reduce puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH) y agentes caótopos como la urea, que rompe puentes de hidrógeno.

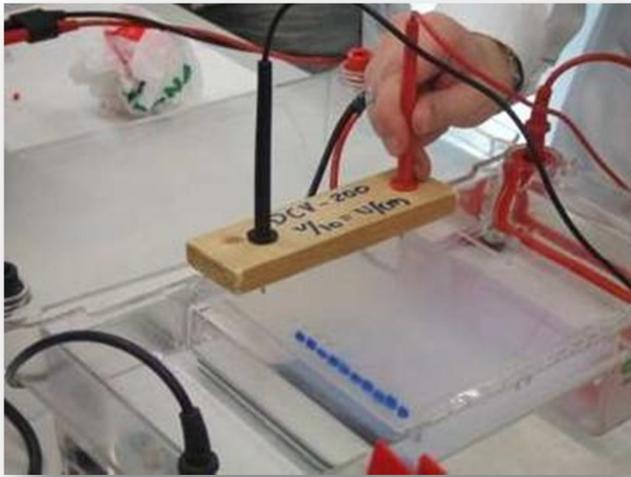


*Gel de poliacrilamida.*

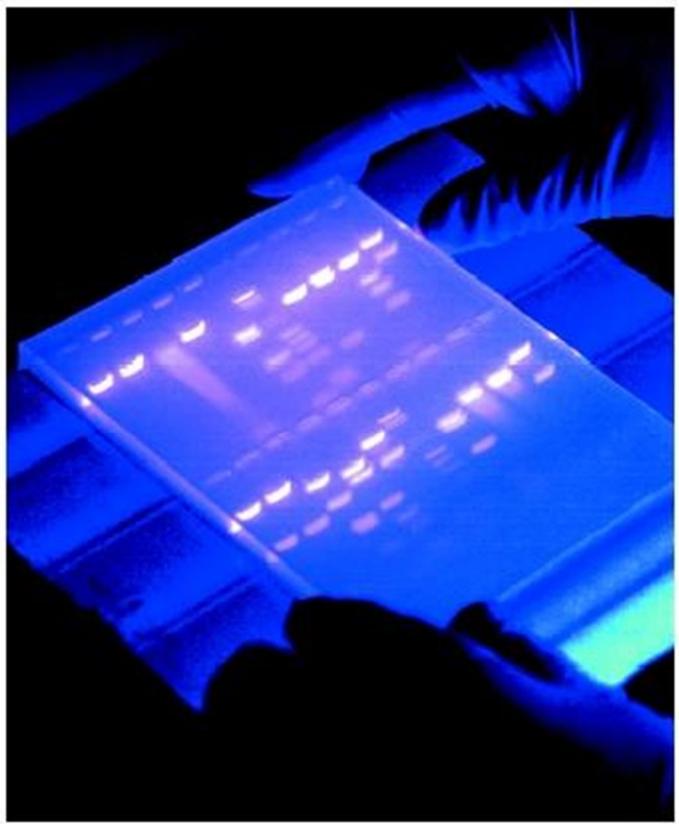


*Se colocan los  
marcadores, el  
control y la  
muestra en el  
gel.*





*Se pasa corriente eléctrica.*



*Terminado el proceso se pueden ver las bandas.*

Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida. <sup>35, 63, 64</sup>

## 🌐 Electroforesis en gel de agarosa.

La agarosa es un polisacárido inerte, no tóxico; posee la propiedad de permanecer líquido por encima de los 50°C y formar un gel semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas. Esta técnica permite separar ácidos nucleicos, a lo largo de un campo eléctrico en función de su tamaño y de su carga eléctrica.

La muestra se coloca en el gel, se aplica un campo eléctrico y se inicia la migración de los fragmentos de ADN a través de los poros de la matriz. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa, por lo que su migración es hacia el polo positivo, la velocidad de migración es inversamente proporcional a su tamaño. Estos fragmentos son teñidos con bromuro de etidio (agente intercalante, que se introduce en la molécula de ADN), al exponerse con luz ultravioleta, se observan las bandas (Ver Figura 20).

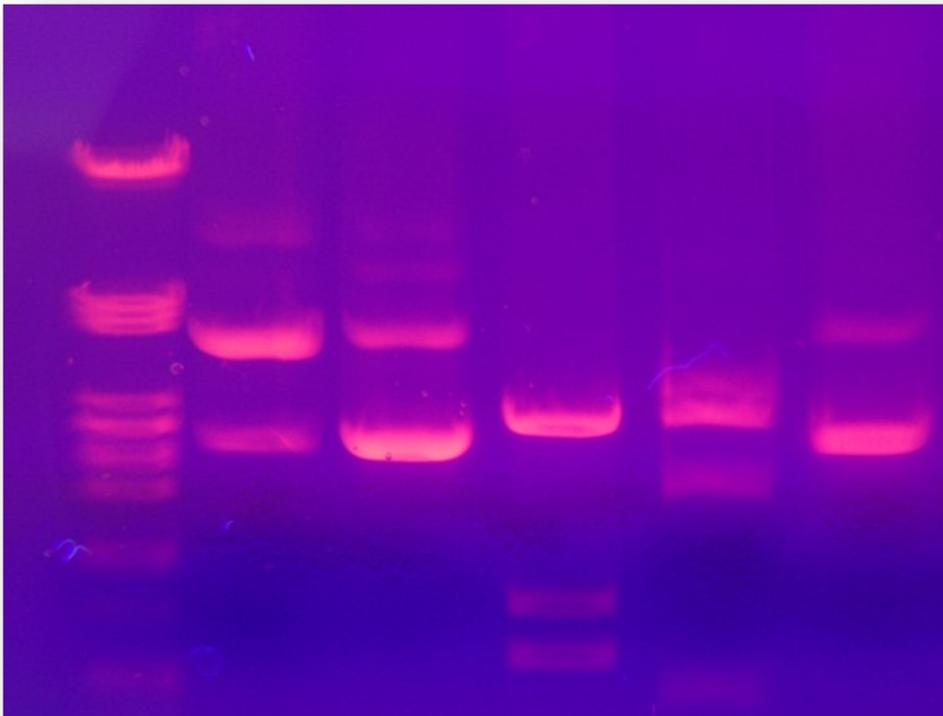


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa.<sup>29</sup>

Fragmentos de ADN teñidos en bromuro de etidio en electroforesis de gel de agarosa.

## ***Electroforesis Bidimensional.***

La electroforesis bidimensional es una técnica que se utiliza para separar proteínas; su fundamento radica en separar las proteínas con base en su punto isoeléctrico y de acuerdo a su peso molecular en gel de poliacrilamida.

En primer lugar las proteínas son separadas en un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturizantes de acuerdo con su punto isoeléctrico. Tras la separación por carga, las proteínas son separadas de acuerdo con su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Finalmente se realiza la tinción del gel, las proteínas aparecen en forma de bandas circulares (Ver Figura 21).

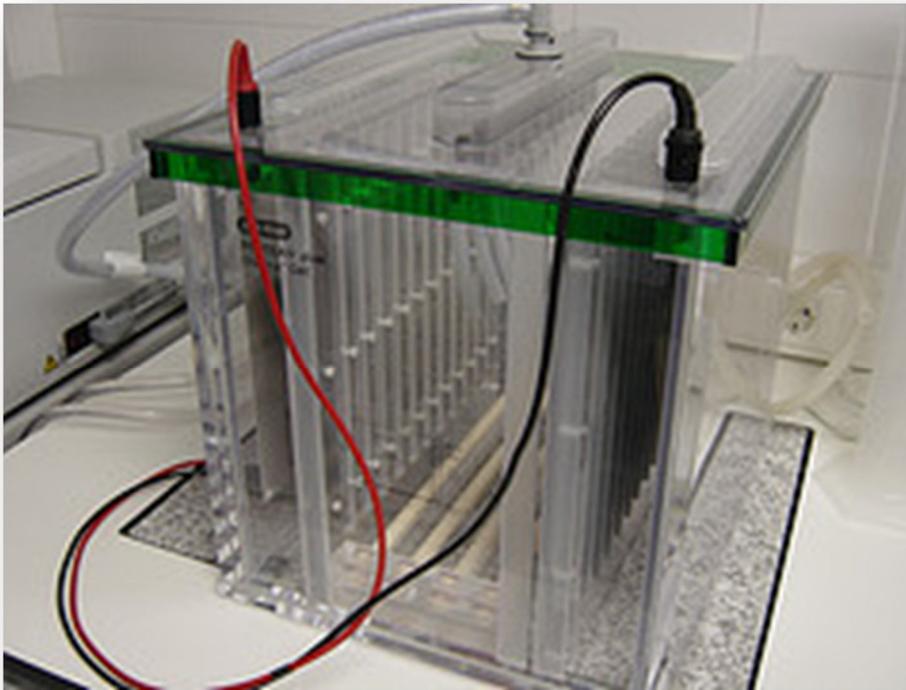


Figura 21. Electroforesis bidimensional.<sup>68</sup>

## ***Isoelectroenfoque.***

Isoelectroenfoque o también llamada electroenfoque es un método donde sustancias anfótericas como los aminoácidos se pueden separar según su punto isoeléctrico y pH (al cual la carga neta de la proteína es nula); esta técnica se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH.

Para establecer el gradiente de pH, donde las moléculas se separen de acuerdo a su punto isoeléctrico; la región del ánodo tiene que ser ácida y la del cátodo alcalina. Las moléculas que se encuentren en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico están cargadas positivamente y migran hacia el cátodo. Las moléculas que estén en medios con pH más bajos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo. El desplazamiento de las moléculas a través del gradiente de pH, se lleva a cabo hasta una región donde el pH coincide con su punto isoeléctrico, así la carga neta es nula (Ver Figura 22).

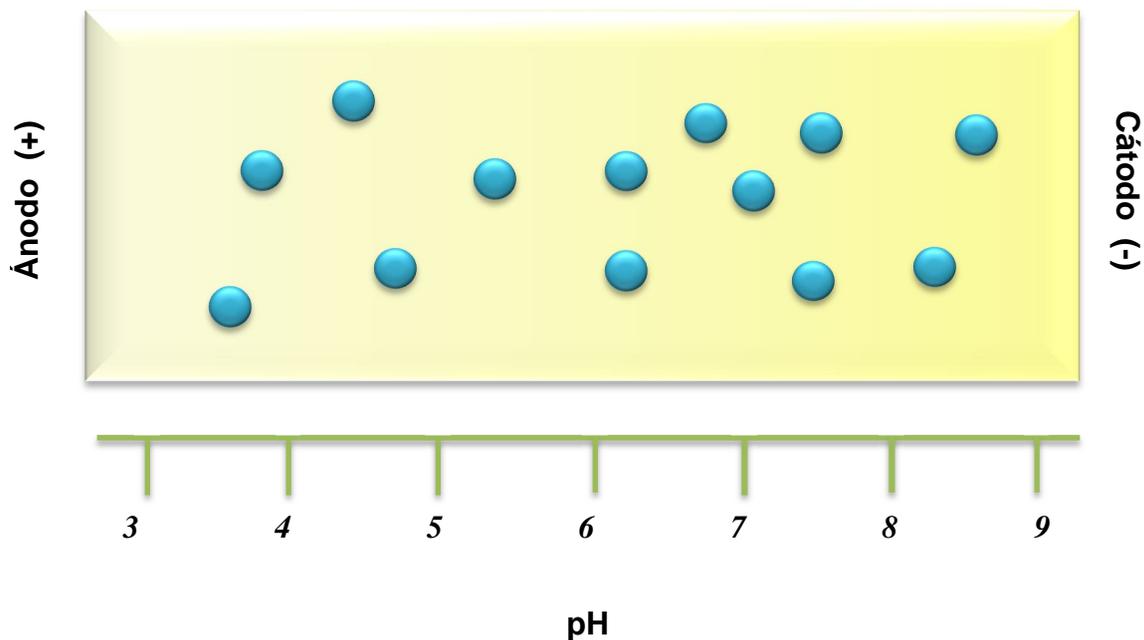


Figura 22.  
Isoelectroenfoque.<sup>70</sup>

## **Cromatografía.**

Es una técnica donde se separan los componentes de una mezcla, por un proceso de migración diferencial. La migración se realiza en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada (fase móvil). Esta fase consiste en un fluido (gases o líquidos) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un analito fijado en un sólido.

Los componentes de la mezcla interactúan de diferente manera y migran de acuerdo a sus diferencias de adsorción, partición solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica.

Los métodos cromatográficos se clasifican de diferentes maneras:

- Cromatografía plana. La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre papel. Las principales técnicas son: cromatografía en papel y cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna, según la fase móvil: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

Dentro de la cromatografía de líquidos se encuentran: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) y cromatografía de exclusión molecular.

Las funciones principales de la cromatografía son, separar los componentes de una mezcla, para purificarlos o para medir las proporciones de los componentes.

### *Cromatografía de papel.*

La cromatografía en papel es una técnica de separación e identificación de sustancias químicas, la fase estacionaria es papel de celulosa y la fase móvil es una solución que consiste en un disolvente o una mezcla de varios líquidos que contienen agua. Se coloca la muestra a un centímetro en el papel, el papel se coloca en un frasco con la fase móvil y por capilaridad la muestra se desplaza a través de la fase estacionaria (Ver Figura 23).

La técnica se basa en la velocidad de desplazamiento diferencial de los solutos al ser arrastrados por la fase móvil sobre la fase estacionaria. La diferencia es la que permite identificar los componentes que posea la mezcla. La movilidad de los componentes de la mezcla a separarse depende de las propiedades de afinidad de las mismas a la fase móvil.



Figura 23. Cromatografía en papel.<sup>71, 77</sup>

Muestra se coloca sobre el papel de celulosa.

### *Cromatografía en capa fina.*

Es una técnica utilizada para la identificación y determinación de pureza de muestras pequeñas. La fase estacionaria es una capa fina de gel de sílice u otro soporte con propiedades adsorbentes, colocada sobre una placa (soporte de vidrio o aluminio), la fase móvil (solvente que puede ser agua, solvente orgánico o mezcla de ambos). El fundamento es el mismo que en la cromatografía en papel.

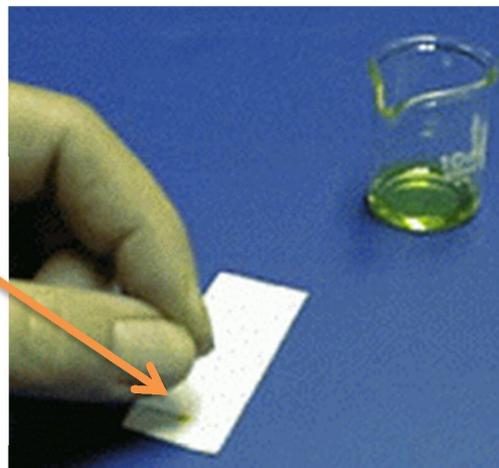
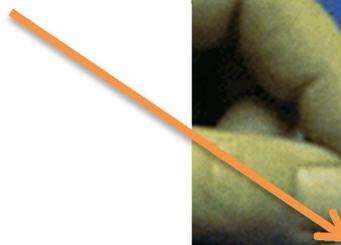
El procedimiento es colocar la muestra a un centímetro del borde de la placa, se coloca a placa en un envase (pequeño tanque que contenga la fase móvil). Se coloca en el envase, se tapa y se deja correr. Si la muestra presenta color se podrá observar cómo se desplaza por capilaridad la muestra, sin no presenta color, se coloca con luz ultravioleta para ver las bandas (Ver Figura 23 y 24).

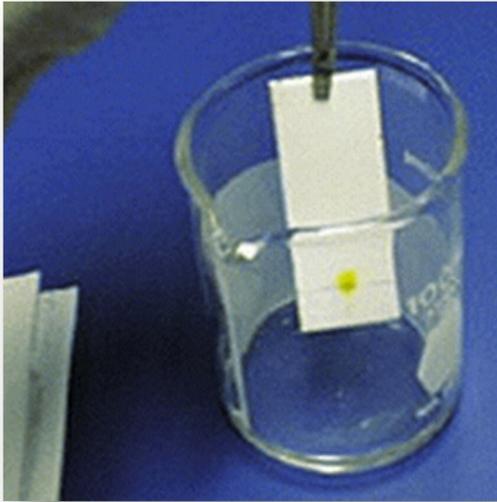
Figura 23. Cromatografía en capa fina.<sup>72</sup>

La muestra se coloca en la placa y esta se introduce en un vaso de precipitado de vidrio con la fase móvil (disolvente), se coloca un vidrio de reloj para mantener el sistema cerrado. Se observa como la fase móvil interactúa con la muestra por capilaridad. Cuando termina el desplazamiento, se deja secar.

Se observa el desplazamiento de la muestra a lo largo de las placas.

Placa de sílice

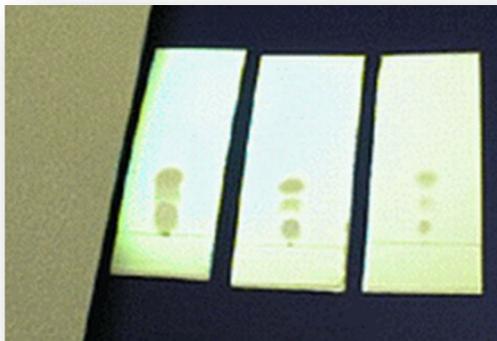
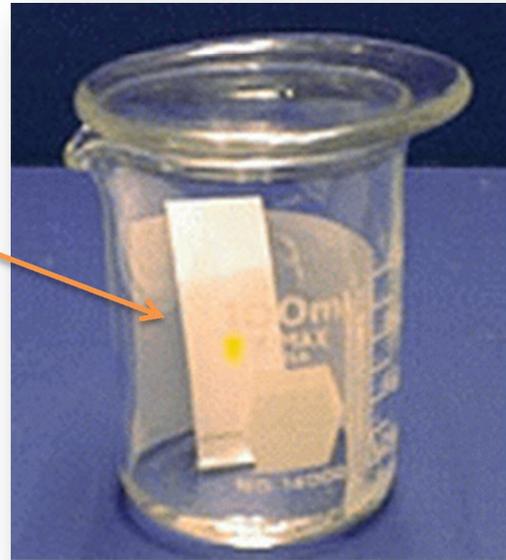
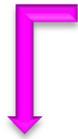




La placa de sílice se  
coloca en la fase móvil



La muestra se desplaza  
por capilaridad.



Placa cromatográfica con la  
muestra desplazada.

Figura 24. Cromatografía en capa fina.<sup>73</sup>

Se observa el desplazamiento de la muestra a lo largo de placa, con luz ultravioleta. Esto se realiza cuando la muestra es incolora.



### *Cromatografía de Intercambio Iónico.*

Es un método de separación, permite que las moléculas se separen con base en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases, la fase estacionaria o intercambiador iónico y la fase móvil. La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil. La fase móvil en este tipo de cromatografía suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas (buffer).

El principio básico de este método es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que las moléculas pueden ser unidas o no unidas cambiando el ambiente iónico. La separación se da con intercambiadores iónicos, se realiza en dos fases: en la primera fase se unen al intercambiador iónico, donde la unión es fuerte y estable y en la segunda fase, los componentes migran a través de la columna con tampones de diferentes pH o diferente fuerza iónica (Ver Figura 25).

Este tipo de cromatografía se utiliza en los procedimientos USP, como pruebas de identificación y valoraciones para medir aniones, cationes inorgánicos, ácidos orgánicos, carbohidratos, alcoholes de azúcar, aminoglicósidos, aminoácidos, glicoproteínas y proteínas.

Por sus características esta técnica se ha aplicado a la fabricación y disposición de productos farmacéuticos, entre los cuales abarca: materias primas, principios activos, excipientes, productos de degradación, impurezas y flujos de proceso.

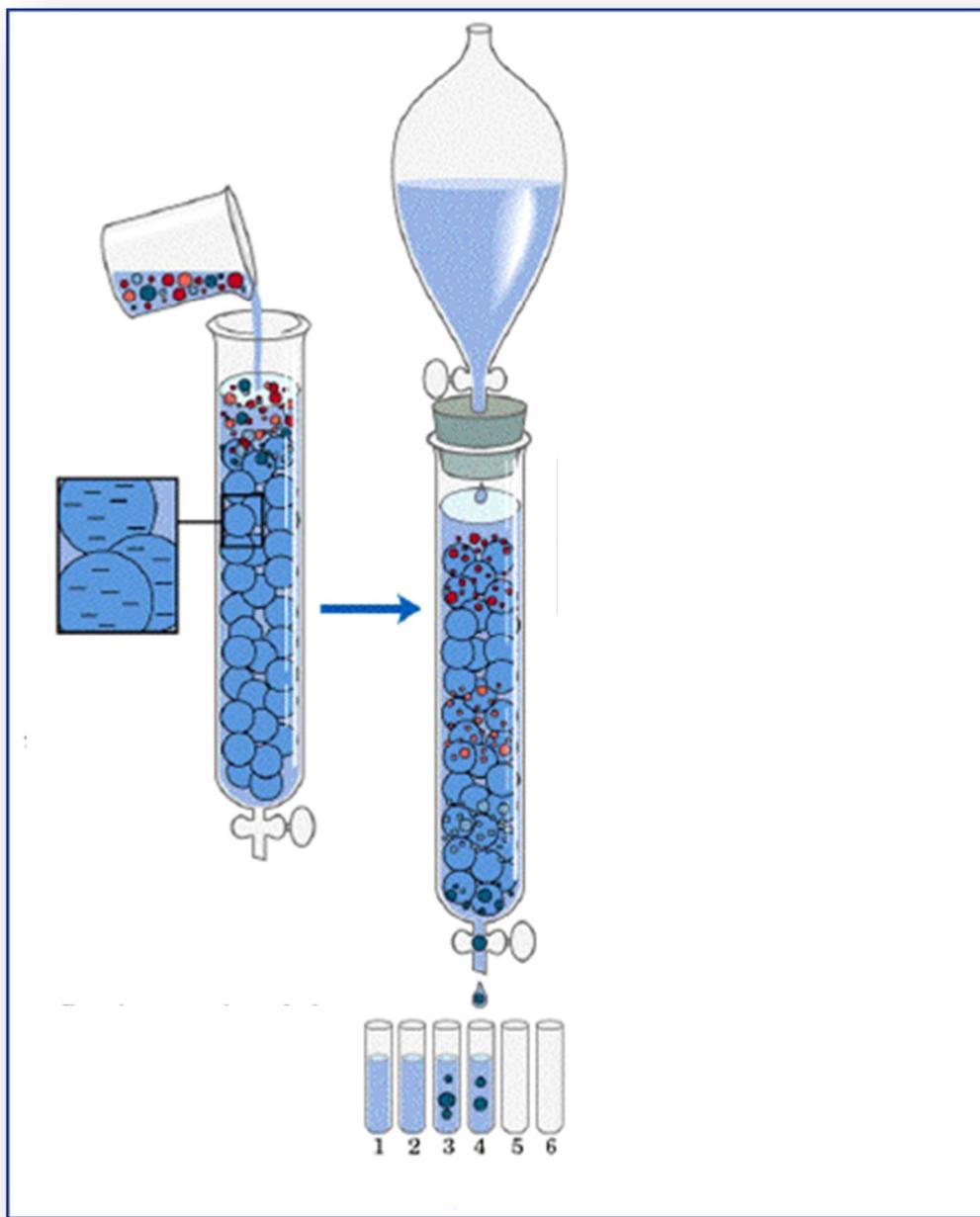


Figura 25. Cromatografía de intercambio iónico.<sup>74</sup>

La fase estacionaria está cargada con grupos funcionales negativamente. La muestra es adicionada a la columna. Los componentes cargados negativamente atraviesan la fase estacionaria sin ser retenidos, mientras que los cargados positivamente son retenidas más tiempo en la columna.

### *Cromatografía de exclusión molecular.*

La cromatografía de exclusión molecular (conocida como filtración en gel o de tamiz molecular) es una de las técnicas empleadas en la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con geles como: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Los geles son la fase estacionaria, se hallan de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta (Ver Figura 26).

Cuando se hace pasar una mezcla con moléculas de distintos tamaños, a través de la columna, las moléculas con un mayor tamaño que el diámetro de los poros harán el camino más corto, ya que nunca entraran a la malla de la fase estacionaria.

Las moléculas pequeñas pueden difundir dentro de la matriz, cuanto menor es su tamaño, tienen mayor facilidad para entrar a un poro. Así, a menor tamaño de la molécula, más largo el camino que seguirá dentro de la malla de la fase estacionaria. Sus principales aplicaciones son:

- Eliminación de fenol de las preparaciones de ácidos nucleicos.
- Eliminación de compuestos de bajo peso molecular marcados.
- Para reacciones entre macromoléculas y reactivos de bajo peso molecular.
- Eliminación de productos, cofactores, inhibidores, etc. de las enzimas.
- Purificación de macromoléculas.
- Determinación del peso molecular de las proteínas.

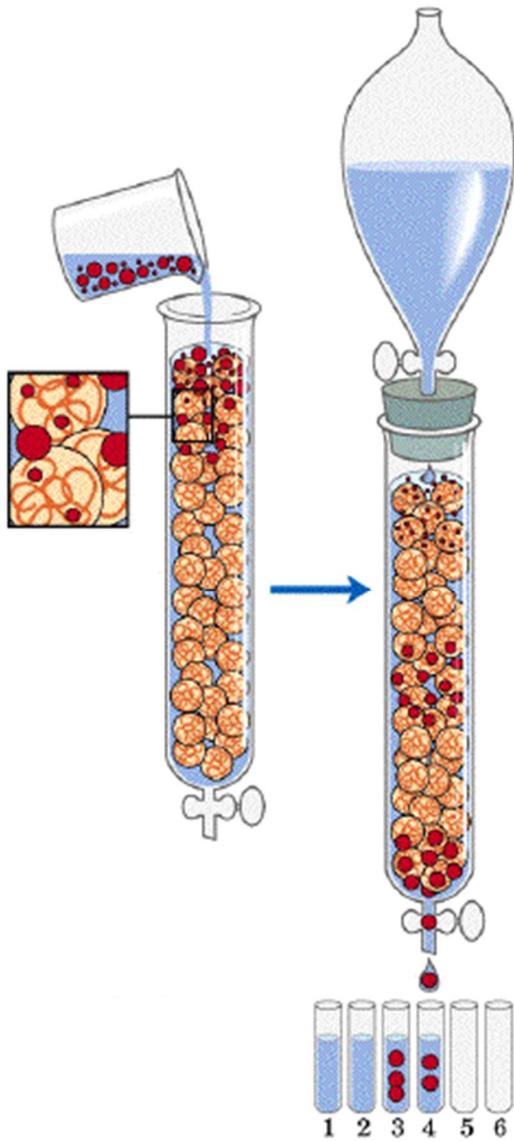


Figura 26. Cromatografía de exclusión molecular.<sup>66</sup>

La muestra es una mezcla de proteína, es colocada en la columna y es separada conforme al tamaño de las mismas.

Y a la derecha se muestra el cromatógrafo de exclusión molecular.

### *Cromatografía líquida de alta resolución. (HPLC).*

Cromatografía líquida de alta resolución conocida como HPLC (High performance liquid chromatography) es una técnica cromatográfica usada para separar compuestos no volátiles o termolábiles, como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas.

Tiene un sistema compuesto por fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector; donde el compuesto pasa a través de la columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil (líquido de alta presión). Ver Figura 27.

La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil e interacciona con la fase estacionaria, el tiempo de retención (tiempo que está el compuesto en la fase estacionaria interaccionando), el gradiente separa la matriz del compuesto en función a la afinidad del mismo por la fase móvil. Los compuestos más usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos como: metanol y acetonitrilo. El gradiente de elución óptimo se observa en forma de picos en el detector.

Existen dos tipos de cromatografía:

- ▶ Cromatografía líquida de alta resolución de fase normal.
- ▶ Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa.

### *Cromatografía de fase normal.*

Esta técnica separa los compuestos de acuerdo a su polaridad, utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, es usada cuando el compuesto es bastante polar.

El compuesto es retenido por la fase estacionaria, la adsorción aumenta con la polaridad del compuesto y la interacción entre el mismo y la fase estacionaria.

La fuerza de interacción depende de los grupos funcionales del compuesto y de los factores estéricos (isómeros estructurales). El uso de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención del compuesto y el uso de disolvente hidrofóbicos lo aumentan.

#### *Cromatografía de fase inversa.*

La HPLC de fase reversa, consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil de polaridad moderada. La adición de disolventes polares incrementa el tiempo de retención y añadir disolventes hidrofóbicos lo disminuyen; por lo que para los compuestos no polares el tiempo de retención es mayor que para los compuestos polares.

El principio básico de este método se basa en las interacciones del disolvente polar, el compuesto no polar y la fase estacionaria no polar.

Existen otros factores que pueden afectar que el tiempo de retención del compuesto sea mayor, como la adición de sales inorgánicas (causa incremento lineal en la tensión superficial de soluciones acuosas) y el pH (modifica la hidrofobia del compuesto). El uso de buffer como fosfato sódico para controlar el pH o el uso de ácido orgánico (ácido fórmico o ácido trifluoracético), ayuda a controlar el pH, neutraliza carga residual del silicato en la fase estacionaria y actúa como formador de pares iónicos para neutralizar la carga del compuesto.

Las columnas de fase inversa son más resistentes que las de fase normal, estas columnas están formadas por una sílica modificada con cadenas alquil, la cual no se debe usar con bases en medio acuoso (dañan la columna) y pueden utilizar ácido en medio acuoso pero no mucho tiempo, ya que corroe las partes metálicas del equipo.



Figura 27. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).<sup>75</sup>

### *Cromatografía de gases.*

La cromatografía de gases es una técnica para la separación de compuestos volátiles. La muestra se inyecta en la columna cromatográfica y la elución se produce por el flujo de la fase móvil (gas inerte). La fase móvil no interacciona con el compuesto, si no es solo transportarlo a través de la columna y al final se encuentra con el detector.

La cromatografía de gases consta de diversos componentes como el gas portador (gas inerte y de alta pureza), el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector. Dependiendo el detector que se use es el tipo de gas portador (He, Ar, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) a usar (Ver Figura 28).

Existen dos tipos de cromatografía de gases:

- ✘ Cromatografía gas-sólido.
- ✘ Cromatografía gas-líquido.

#### Cromatografía gas-sólido.

En esta técnica la fase estacionaria es sólida y la retención del compuesto; su fundamento radica en el proceso de adsorción. El compuesto es retenido sobre la superficie de la fase estacionaria, la cual es semipermanente y los picos de elución son con colas. Su aplicación es la separación de compuestos de bajo peso molecular.

#### Cromatografía de gas-líquido.

Este tipo de cromatografía se basa en la distribución del compuesto entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

Su aplicación es principalmente a contaminantes de agua como insecticidas, pesticidas, desechos industriales también se analizan para constituyentes de gasolina mezclas de gases de refinería, gases de combustión, etc.



Figura 28. Cromatógrafo de gases.<sup>76</sup>

Las principales cromatografías utilizadas en la industria farmacéutica son: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico.

## ***Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).***

La Reacción de polimerasa en cadena (PCR) es una técnica que permite amplificar una secuencia de ADN, las muestras pueden proceder de cualquier fuente biológica o que estén almacenadas por mucho tiempo.

Antes de iniciar con el procedimiento, se inicia con la construcción del cebador para la PCR, se debe conocer la secuencia de nucleótidos de segmentos cortos en ambos lados de ADN blanco, a estos segmentos se les conoce como secuencias flanqueadoras. Estas secuencias se emplean para construir dos oligonucleótidos de cadena sencilla; estos oligonucleótidos funcionan como cebadores para la PCR.

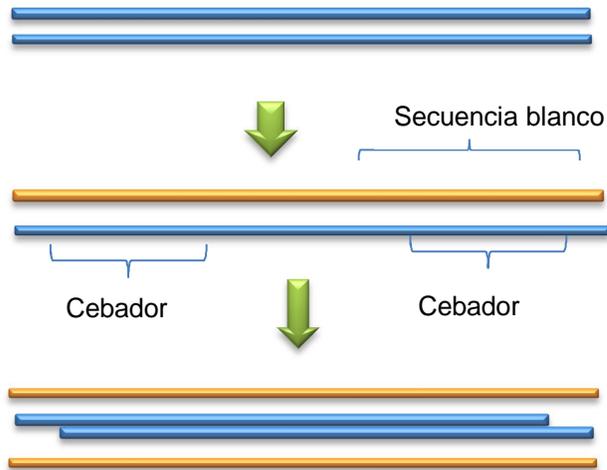
La técnica emplea la polimerasa de ADN para amplificar de forma repetida segmentos de ADN, el método realiza ciclos repetidamente entre veinte y cuarenta veces en tres etapas, cada uno a diferentes temperaturas (Ver Figura 29).

Las tres etapas:

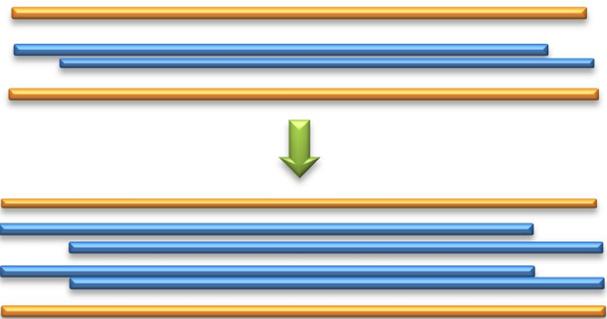
- 1. Desnaturalización.** Con calor se desnaturaliza el ADN, formando dos cadenas sencillas.
- 2. Hibridación.** Las cadenas separadas se enfrían y los cebadores reconocen, hibridan y delimitan la secuencia que se desea amplificar.
- 3. Adición.** Se adiciona a la ADN polimerasa (enzima bacteriana, termoestable) y los trifosfatos de desoxirribonucleico, para iniciar la síntesis de las cadenas complementarias de ADN. La ADN polimerasa agrega nucleótidos al extremo hidroxilo 3' del cebador y el crecimiento de la cadena se extiende sobre el ADN blanco, así se forman las copias complementarias del blanco. Al final de un ciclo de replicación, se desnaturalizan las cadenas de ADN por calentamiento, para que haya el doble de cadenas. Cada cadena de ADN se une con un cebador complementario y se repite el ciclo.

Una vez terminado el proceso se analiza con técnicas de electroforesis en gel, hibridación Southern o identificación directa de la secuencia.

PRIMER CICLO



SEGUNDO CICLO



TERCER CICLO

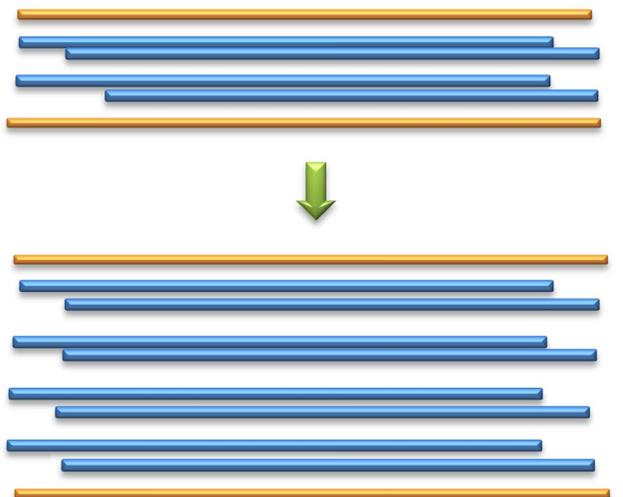


Figura 29. Reacción de Polimerasa en cadena (PCR).<sup>34</sup>

Se muestran múltiples ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa.

## ***Técnicas Southern, Northern y Western blotting.***

La hibridación de [ácidos nucleicos](#) es un proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias, en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice, donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior.

Estas técnicas permiten estudiar y analizar los productos de la expresión genética. La técnica Southern para ADN, las técnicas Northern y Microconjuntos para ARN, y las técnicas Ensayos de Inmunoabsorción ligada a enzimas conocida como ELISA, Western-blot, y Proteómica (Ver Cuadro 3).

**Cuadro 3** Técnicas empleadas para analizar ADN, ARN y proteínas<sup>33</sup>.

<b>TÉCNICA</b>	<b>MUESTRA ANALIZADA</b>	<b>PROPÓSITO</b>
<b>Southern</b>	ADN	Detecta ADN.
<b>Northern</b>	ARN	Mide cantidades de ARNm.
<b>Western</b>	Proteína	Mide cantidad de proteínas.
<b>Microarreglo</b>	ARN o ADNc	Mide muchos niveles de ARNm.
<b>Proteómica</b>	Proteínas	Mide abundancia, distribución, modificaciones postraduccionales, funciones e interacciones con otras macromoléculas.

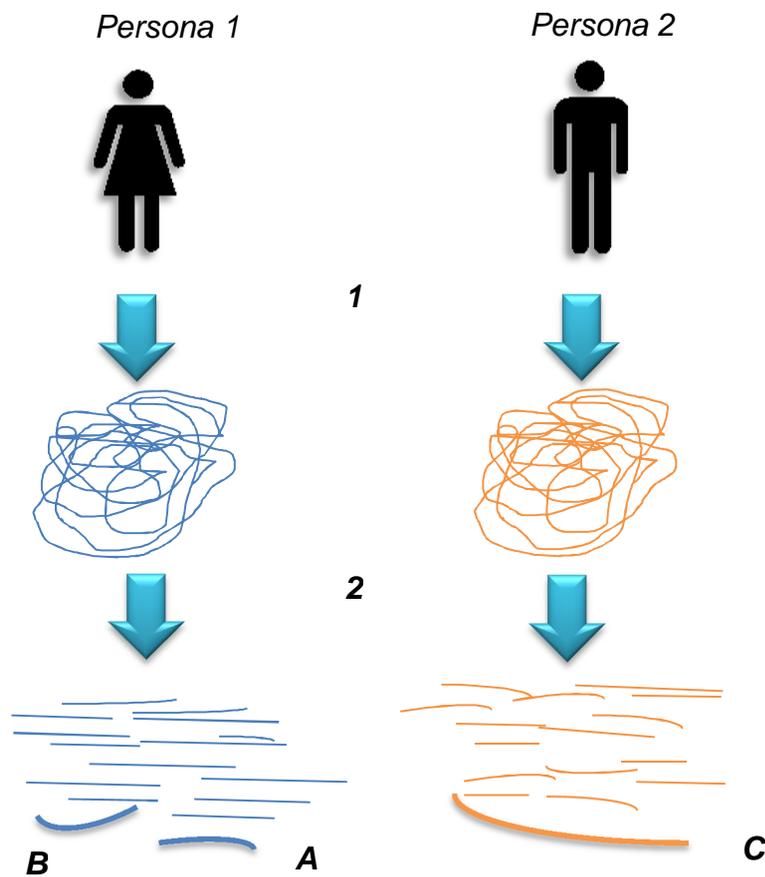
## SOUTHERN BLOT.

La técnica Southern permite la identificación de secuencias específicas de ADN, mediante el uso de electroforesis en gel y de hibridación utilizando sondas específicas. Etapas para realizar un Southern (Ver Figura 30):

- 1. Extracción de ADN.** Se extrae el ADN de tejido humano, las fuentes son: sangre, semen, tejido, células de folículo capilar y saliva.
- 2. Digestión de ADN con enzimas de restricción.** El ADN se corta en fragmentos con enzimas de restricción.
- 3. Electroforesis en gel de agarosa.** Los fragmentos resultantes se separan de acuerdo a su tamaño. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa, por lo que los fragmentos más pequeños migran más rápido que los fragmentos de mayor tamaño hacia el polo positivo.
- 4. Preparación de ensayo southern.** Los fragmentos separados en el gel de electroforesis no se tiñen, sino que se adiciona una solución alcalina para neutralizar. Así se transfiere a una membrana de nitrocelulosa. Esto es semejante a calcar, ya que se conserva la distribución espacial.
- 5. Hibridación con sonda radioactiva.** El emparejamiento de las bases complementarias entre las secuencias de la sonda y del ADN, determina la formación de la molécula. La sonda se marca con isotopo radioactivo  $^{32}\text{P}$ .
- 6. Detección de los RLP'S mediante autorradiografía.** Las posiciones de la sonda radiactiva sobre la membrana se detectan para la autorradiografía. La membrana de nitrocelulosa se lava (para eliminar el material que no se haya asociado a la sonda) junto con la película de rayos X, se aísla de la luz. La película registra las posiciones donde hay desintegración.
- 7. Reensayar el resultado del southern con sondas adicionales.** Una vez realizado el revelado se lava la radioactividad con disolución elevada de temperatura, se hibrida con una segunda sonda que se une a un locus diferente del primero. El perfil de ADN se le conoce como el grupo de autorradiografías de la transferencia de Southern.

Figura 30. Etapas de la Técnica Southern.<sup>34</sup>

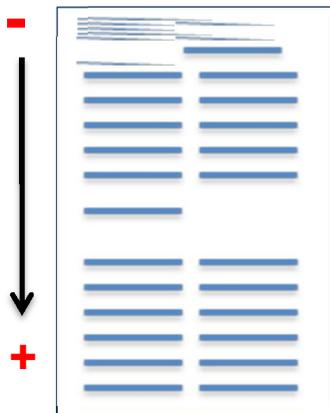
1. Extracción del ADN.
2. Digestión del ADN con enzimas de restricción.
3. Los fragmentos resaltados son los que reconocen la sonda. En las dos personas el sitio de reconocimiento es distinto, en la persona 1 (**A** y **B**) y en la persona 2 (**C**).
4. Los fragmentos de ADN se colocan en un gel de electroforesis sin teñir y después se transfieren a una membrana de nitrocelulosa.
5. Se hibridan con una sonda  $^{32}P$  (bandas rojas).
6. Se expone la película a rayos X, así se forman híbridos con la sonda radioactiva y los fragmentos **A**, **B** y **C** (bandas rojas).



3

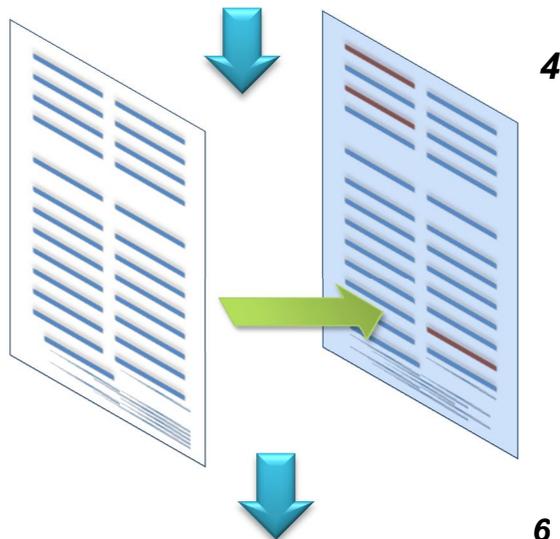


Electroforesis en agarosa



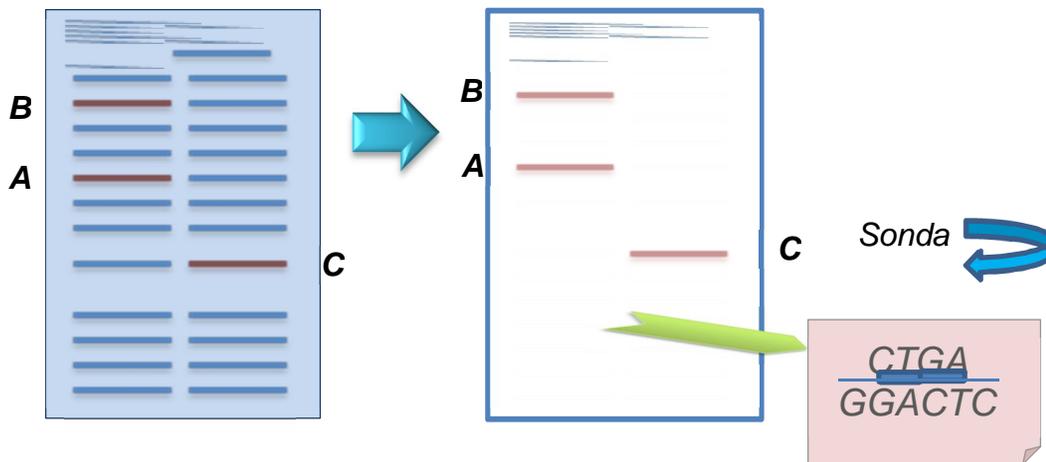
Persona 1

Persona 2



5

6



## ***NORTHERN BLOT.***

Northern es una técnica para realizar la identificación de secuencias de ácido ribonucleico (ARN) en una muestra, con sondas específicas de ADN.

El procedimiento de esta técnica es el mismo que en el de Southern, la muestra se coloca y se separa en electroforesis de gel, tras la digestión con enzimas de digestión. Posteriormente los fragmentos de ARN se transfieren del gel a la membrana de nitrocelulosa o nylon y se realiza la hibridación con una sonda marcada radioactivamente.

## ***CHIPS DE ADN O MICROARRAYS.***

Los microarrays son colecciones de oligonucleótidos de ADNc, se usan para el estudio de mutaciones genéticas de genes conocidos o para monitorizar la expresión genética de una preparación de ARNm.

Su fundamento radica en la capacidad de ADNc de hibridar entre sí. Una muestra de ARNm es utilizado como molde para hacer una molécula de ADNc con la transcriptasa inversa. Se adiciona un marcador fluorescente y se coloca en un chip génico (portaobjetos de vidrio o en una membrana) que posee pequeñas cantidades de ADN en forma de puntos. Cada círculo corresponde a un gen diferente y la magnitud de fluorescencia es la cantidad de ADN que está unido con el ADNc marcado (Ver Figura 31).

## **WESTERN BLOT.**

Es una técnica que sirve para la detección de proteínas. El procedimiento es igual que en el de Southern, las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño en gel de electroforesis y se transfiere a una membrana de nylon o nitrocelulosa. La diferencia con la otra técnica es que se utiliza un anticuerpo marcado como sonda, la cual produce una banda visible cuando se une al antígeno.

## **PROTEÓMICA.**

Es el estudio de las proteínas expresadas por un genoma (proteoma), incluyen su distribución, funciones, estructura, modificaciones postraduccionales e interacciones con otras macromoléculas. El proteoma varía según su estado en el que se encuentre la célula, ya sea por algún tratamiento hormonal o farmacológico o por estrés; por esta razón es diferente en cada individuo el perfil de proteínas expresada.

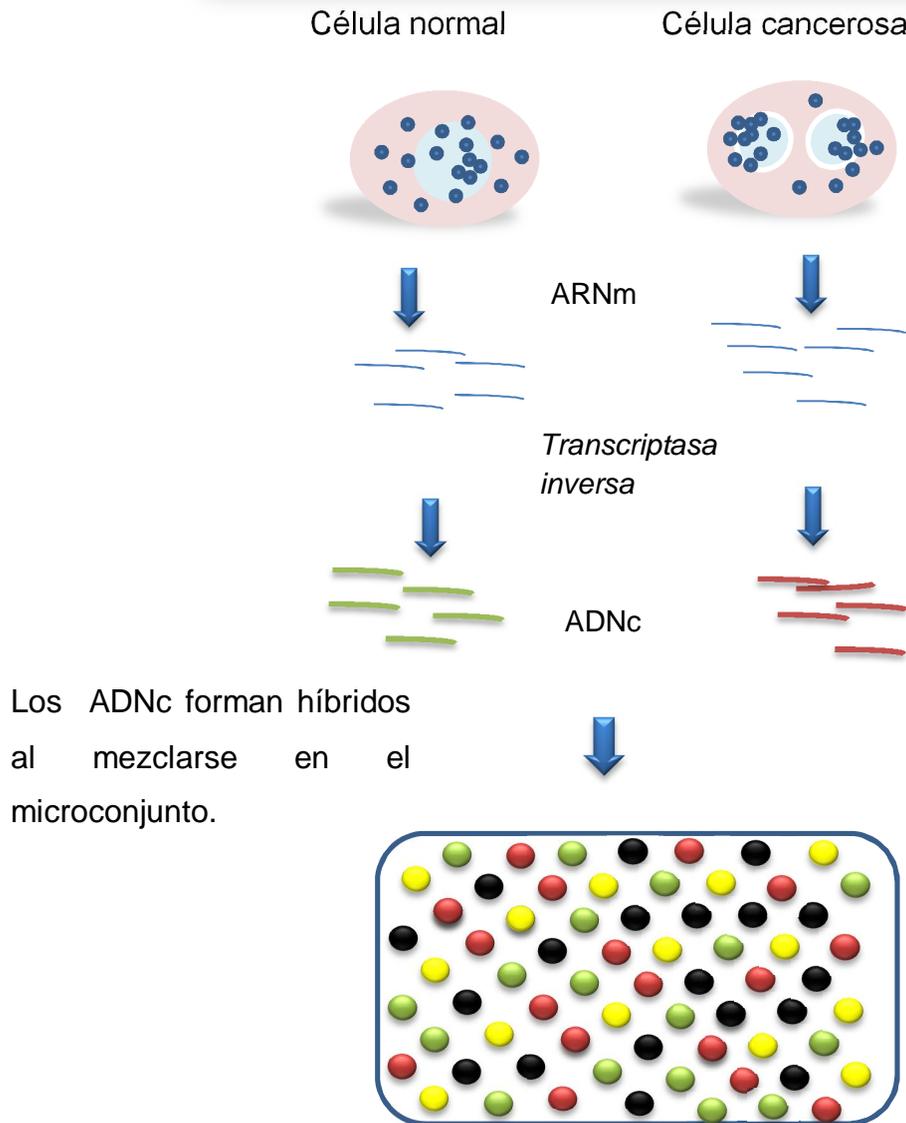
La proteómica se aplica en la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en la patogenia de enfermedades y el análisis de procesos de transducción de señales.

Hay tres clasificaciones de la proteómica:

- 1. Proteómica de expresión.** Se encarga del estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones postranscripcionales.
- 2. Proteómica estructural.** Se encarga de la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas.
- 3. Proteómica funcional.** Se encarga de la localización y distribución subcelular de proteínas y de las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función

Figura 31 Microarrays. <sup>34</sup>

Análisis por microconjuntos de la expresión genética.



**Mancha negra (●):** ninguna célula produce mensaje.

**Mancha roja (●):** célula cancerosa produce más de este mensaje.

**Mancha amarilla (●):** ambas células producen la cantidad de mensaje.

**Mancha verde (●):** la célula normal produce más de este mensaje.

## CAPÍTULO 4

# MARCO LEGAL Y REGULATORIO DE MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

Hasta el momento, el marco regulatorio de la Unión Europea es el más avanzado, en México este tema ha sido adoptado con gran interés, y desarrollado a lo largo de los años.

### **Regulación.**

#### *Internacional.*

La Agencia Europea para la Aprobación de productos Farmacéuticos (EMA por sus siglas en inglés), fue una de las primeras autoridades a nivel mundial en emitir guías de aprobación de medicamentos derivados de la biotecnología. Estas directrices enfocadas en los criterios generales para la producción, comercialización, control de calidad, estudios de estabilidad, evaluación de la seguridad viral, entre otros. Asimismo existen directrices específicas para algunas clases de productos biotecnológicos (anticuerpos y citoquinas), para medicamentos producidos por plantas, para medicamentos producidos en animales transgénicos y para medicamentos y para medicamentos biosimilares (término europeo para los medicamentos biocomparables).<sup>9</sup>

En contraste con otros países que no han establecido los procesos mínimos para que sus autoridades aprueben el uso y comercialización de biotecnológico, en estos casos, se incurre en un grave riesgo para los pacientes, dado que no se puede garantizar la calidad, eficacia y seguridad de este tipo de medicamentos.

Los avances y las limitaciones de los métodos y técnicas disponibles hasta la fecha para la caracterización completa de los medicamentos, han llevado al Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de la EMA a desarrollar guías específicas sobre calidad, los aspectos clínicos y no-clínicos que se deben tener en cuenta en el desarrollo de medicamentos biotecnológicos

También deben satisfacer los requisitos técnicos de las monografías de la Farmacopea Europea, además de los requisitos adicionales que se definan en las guías CHMP e ICH (Conferencia Internacional de Armonización). Ver cuadro 4.

**Cuadro 4** Guías aplicables al desarrollo farmacéutico de medicamentos biotecnológicos.<sup>10-14</sup>

<b>EMA/CPMP/BWP/328/99</b>	<b>Desarrollo farmacéutico para productos biotecnológicos y biológicos. Anexo. Guía de Desarrollo Farmacéutico CPMP/QWP/155/96</b>
<b>ICH Q5E</b>	<b>Guía de Calidad de los medicamentos Biotecnológicos / Biológicos. Sujeto a cambios en sus Proceso de Fabricación.</b>
<b>ICH Q5C</b>	<b>Guía de Calidad de productos biotecnológicos ensayos de estabilidad de productos biotecnológicos / biológicos. CPMP/ICH/138/95</b>
<b>ICH Q6B</b>	<b>Guía de especificaciones ensayos y criterios de aceptación para productos biotecnológicos / biológicos. CPMP/ICH/365/96</b>
<b>ICH S6</b>	<b>Evaluación de la seguridad preclínica de productos obtenidos por biotecnología. CPMP/ICH/302/95</b>

## **Nacional.**

*Secretaría de Salud (SSA), Ley General de Salud (LGS), Reglamento de Insumos para la Salud (RIS), Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)*

En México la Secretaría de Salud (SSA) tiene por función planear, normar, coordinar y evaluar el Sistema Nacional de Salud y proveer a la adecuada participación de las dependencias y entidades públicas que presten servicios de salud, a fin de asegurar el cumplimiento del derecho a la protección de la salud. El Reglamento de Insumos para la Salud (RIS), es el documento donde se publican los aspectos generales de las reformas propuestas y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es una agencia reguladora con autonomía técnica, administrativa y operativa, que tiene como misión proteger a la población contra riesgos sanitarios, para lo cual integra el ejercicio de la regulación, control y fomento sanitario bajo un solo mando, dando unidad y homogeneidad a las políticas que se definan.

Tras más de un año de debate entre los legisladores, la administración pública federal y el sector productivo con la participación de la industria farmacéutica, el Congreso aprobó en abril de 2009 una reforma a la Ley de General de Salud. La reforma se publicó en el Diario Oficial de la federación (DOF) el 11 de junio de 2009 y entró en vigor el 10 de septiembre del mismo año. El principal objetivo fue establecer las condiciones adecuadas para autorizar los registros de medicamentos biotecnológicos, así como especificar la farmacovigilancia y criterios generales de etiquetado e importación.

La aprobación de la reforma ha impulsado significativamente la actualización de nuestro marco.

El 21 de julio del 2010 la COFEPRIS sometió el proyecto de reformas al Reglamento de Insumos para la Salud ante la Comisión Federal de Mejora Regulatoria (COFEMER), que es la instancia del ejecutivo federal encargada de revisar y aprobar cualquier modificación reglamentaria. El 19 de octubre de 2011

se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) las nuevas disposiciones para medicamentos biotecnológicos que van desde su decisión, clasificación, requisitos para obtener el registro sanitario, requisitos para su liberación dentro del país, así como, los requisitos (análisis preclínicos y clínicos) que debe tener un medicamento biotecnológico para entrar al país; entrando en vigor ochenta días después de la publicación.

Cuatro puntos fundamentales lograron quedar plasmados:

1. El uso de Denominación Común Internacional como método de identificación de los medicamentos biotecnológicos.
2. La importancia de que en el Cuadro Básico se cree libre competencia entre los medicamentos innovadores y biocomparables a través de la sustitución de los mismos.
3. Se pedirán los estudios (clínicos o no clínicos) que sean necesarios.
4. El subcomité de Medicamentos Biotecnológicos serán considerados por la COFEPRIS como una opinión, pero la última decisión siempre recaerá en esta última.

## **CAPÍTULO 5**

### **REGISTRO SANITARIO**

### **MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.**

El registro sanitario de un medicamento es para llevar un control, ya que ningún producto tiene en su concepción riesgo cero; todos pueden causar daño en determinadas circunstancias. En México el 27 de abril del 2010 se publicó en el Diario Oficial de la Federación y entró en vigor a los ciento ochenta días de su publicación.

#### **EL ARTÍCULO 222 DE LA LEY GENERAL DE SALUD.**

**Artículo Único.-** Se reforma el artículo 222 de la Ley General de Salud, para quedar como sigue:

**Artículo 222.-** La Secretaría de Salud sólo concederá la autorización correspondiente a los medicamentos, cuando se demuestre que éstos, sus procesos de producción y las sustancias que contengan reúnan las características de seguridad, eficacia y calidad exigidas, que cumple con lo establecido en esta Ley y demás disposiciones generales, y tomará en cuenta, en su caso, lo dispuesto por el artículo 428 de esta Ley.

Para el otorgamiento de registro sanitario a cualquier medicamento, se verificará previamente el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación y del proceso de producción del medicamento así como la certificación de sus principios activos. Las verificaciones se llevarán a cabo por la Secretaría o sus terceros autorizados o, de ser el caso, se dará reconocimiento al certificado respectivo expedido por la autoridad competente del país de origen, siempre y cuando existan acuerdos de reconocimiento en esta materia entre las autoridades competentes de ambos países.

El 19 de octubre de 2011 se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el **Reglamento de Insumos para la Salud (RIS)** Capítulo VIII MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.

## **ARTÍCULO 177.**

Para obtener el registro sanitario de medicamentos biotecnológicos innovadores, se requiere presentar solicitud en el formato oficial, que para tal efecto se publique en el Diario Oficial de la Federación, a la que se anexará la información documental siguiente:

- I. La monografía del biofármaco, composición y fórmula;
- II. El origen e historia del banco celular maestro, el gene, la construcción del sistema de expresión vector-hospedero para la proteína de interés y la caracterización relevante del genotipo y fenotipo;
- III. El resumen del proceso de fabricación del biofármaco: cepa o línea celular, fermentación, separación y purificación, así como el diagrama de flujo correspondiente a dicho proceso;
- IV. Los métodos analíticos: físicos, químicos y biológicos para materias primas y biofármacos, así como el reporte de validación de sus resultados, realizados por el fabricante, para los casos en que no sean métodos farmacopéicos;
- V. El reporte de la validación del proceso de fabricación, realizado por el fabricante;
- VI. La monografía del medicamento que incluya la Denominación Común Internacional, forma farmacéutica, especificaciones cualitativas y cuantitativas;
- VII. Los procesos de fabricación, formulación, llenado y acondicionamiento, así como sus controles del proceso;
- VIII. Los proyectos de etiqueta y del instructivo correspondiente, así como las especificaciones de los envases primario y secundario, de conformidad con la Ley, este Reglamento y demás disposiciones aplicables;

- IX.** Programa de farmacovigilancia intensiva, de conformidad con las disposiciones que resulten aplicables, y
- X.** Los estudios preclínicos y clínicos que señale la Secretaría como necesarios para demostrar la seguridad, eficacia y calidad del producto, de acuerdo a lo establecido en la Ley, este Reglamento y demás disposiciones jurídicas aplicables, incluyendo el reporte de eventos adversos e inmunogenicidad, caracterizando la respuesta inmune y la evaluación de la correlación entre anticuerpos neutralizantes de la farmacocinética y farmacodinamia del producto.

Todos los medicamentos biotecnológicos innovadores, deberán presentarse para ser evaluados ante el Comité de Moléculas Nuevas y deberán ser estudiados por el Subcomité de Evaluación de Productos Biotecnológicos previamente al sometimiento de la solicitud de registro sanitario, para determinar si las pruebas clínicas son efectivas para demostrar su seguridad, calidad y eficacia.

Para el caso de medicamentos biotecnológicos innovadores de fabricación extranjera además de los documentos anteriores se deberán anexar los establecidos en las fracciones I, II y III del artículo 170 del Reglamento de Insumos para la Salud (RIS).

**ARTÍCULO 170.** Para obtener el registro sanitario de medicamentos de fabricación extranjera, se requiere:

- I.** El certificado de libre venta expedido por la autoridad sanitaria del país de origen;
- II.** El certificado de que la empresa cuenta con el permiso para fabricar medicamentos y constancia de buenas prácticas de fabricación expedida por la autoridad correspondiente del país de origen, y
- III.** La carta de representación, cuando el laboratorio que lo fabrique en el extranjero no sea filial o casa matriz del laboratorio solicitante del registro.

La SSA resolverá las solicitudes de registro de medicamentos biotecnológicos innovadores en un plazo de ciento ochenta días naturales, contados a partir del día siguiente a aquel en que se presente la solicitud de registro correspondiente. La Secretaría podrá solicitar información faltante, por única ocasión, durante los primeros ciento veinte días naturales del plazo antes referido, teniendo el interesado un máximo de cien días hábiles para responder, a partir del día siguiente a aquel en que haya sido notificado de la prevención respectiva.

En caso de que la Secretaría no emita la resolución respectiva en el plazo señalado, la solicitud de registro se entenderá resuelta en sentido negativo.

# ETAPAS DE DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO (METODOLOGÍA).

El desarrollo de un medicamento, es un proceso largo, complejo y comprende diversas etapas: la primera es la Fase de investigación básica ó descubrimiento (se demuestra la actividad del principio activo, comienza su desarrollo y finaliza la investigación), la segunda es la Fase desarrollo preclínico (su formulación farmacéutica, farmacología, toxicología y estudios ADME ), la tercera es la Fase desarrollo clínica (Fase I- Fase IV) y la cuarta es la Fase de Aprobación y Registro.

Figura 19<sup>5</sup>. Etapas del desarrollo de un medicamento.



## **ETAPA DE INVESTIGACIÓN BÁSICA Ó DESCUBRIMIENTO.**

El primer paso es definir el objetivo; esto es con base en los intereses científicos, dependiendo de la patología a la que va dirigida la investigación.

La etapa de investigación básica para un medicamento biotecnológico ocurre en cinco pasos:

1. Identificación de la molécula con la actividad biológica deseada o proteína
2. Aislamiento del gen
3. Clonación del material genético y expresión de la proteína
4. Producción a escala (proceso de escalamiento)
5. Asegurarse de la calidad de la proteína y de la integridad del proceso.

En el cuadro 5 se observan las etapas de tecnología de ADN recombinante.

**Cuadro 5.** *Tecnología de ADN recombinante*<sup>36</sup>.

<b>ETAPA</b>	<b>PROCESO</b>
<b>Primera</b>	<i>Identificación de la proteína.</i> Aislar a la proteína. Descripción de las propiedades biológicas. Estructura de la proteína hasta la secuencia de amino ácidos y mapeos, glicosilacion puentes disulfuro, dominios peptídicos.
<b>Segunda</b>	<i>Aislamiento del gen (existen tres métodos)</i> 1. Secuencia triplete de ácido nucleico por secuencia de aminoácidos. 2. Aislamiento de ARNm con la transcriptasa reversa y ADN

	<p>complementario.</p> <p>3. Sondas de ADN para bibliotecas genéticas.</p>
<b>Tercera</b>	<p><i>Clonación y expresión:</i></p> <p>Inserción del gene (humano) dentro del plásmido.</p> <p>Incorporación del plásmido en la célula huésped.</p> <p>Producción celular de proteínas.</p> <p>Creación del banco celular.</p>
<b>Cuarta</b>	<p><i>Producción a escala:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Inoculación.</li> <li>■ Fermentación o cultivo celular.</li> <li>■ Purificación de la proteína.</li> <li>■ Formulación.</li> </ul>
<b>Quinta</b>	<p><i>Aseguramiento de calidad:</i></p> <p>Las pruebas genéticas.</p> <p>Pruebas de producto a volumen.</p> <p>Proceso de validación.</p> <p>Las pruebas de producto final.</p>

## **1. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.**

Lo primero es identificar y aislar la proteína de interés de una fuente biológica, la cual puede ser de un fluido corporal o celular.

Conocer las características, propiedades físicas y biológicas de la proteína de interés, así como su estructura.

## **2. AISLAMIENTO DEL GEN.**

Primero se debe aislar el gen humano responsable de la proteína, el cual se lleva en tres pasos.

**Primer paso.** Conocer el código de 64 tripletes de los 20 aminoácidos, que codifican para la proteína de interés, así mediante simuladores se pueden construir la genética de los genes.

**Segundo paso.** Encontrar y aislar el ARNm, del gen. Y construir una biblioteca de ADNc con la enzima transcriptasa inversa.

**Tercer paso.** Utilizar una sonda para rastrear la biblioteca de ADNc, una vez conocida la secuencia de aminoácido y así encontrar la secuencia del gen de interés.

Cada secuencia es evaluada por análisis genético para determinar características estructurales y propiedades farmacológicas.

## **3. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN.**

Antes de iniciar la clonación se debe seleccionar el sistema de expresión donde se va producir la proteína de interés.

Un sistema de expresión es aquel donde se realiza la clonación, la selección del sistema de expresión para producir una proteína de interés depende de las características físico-químicas y modificaciones postraduccionales de la proteína, la cantidad que se requiere producir, la localización del producto (intra, extra o en

la membrana celular). Existen dos sistemas de expresión, el primero son células de mamífero y el segundo son células bacterianas. En el primero son los ovarios de hámster chino (CHO en inglés) y el segundo el más usado es Escherichia coli, sin embargo existen otros como Saccharomyces cerevisiae.

La clonación es la reproducción del gen blanco o gen control en células bacterianas o células de mamífero. El procedimiento comienza con un corte específico en el vector (plásmido) para abrirlo e insertar el gen humano y cerrarlo con una enzima ligasa. Posteriormente comienza la replicación del vector y del gen, dando como resultado una molécula de ADN recombinante, que contiene la secuencia del gen dentro del plásmido. La molécula de ADN recombinante se incorpora en la célula huésped.

La transferencia de una molécula de ADN recombinante a una célula huésped es una etapa esencial, puede ser de forma natural, es decir la célula receptora puede introducir el ADN externo a su interior sin necesidad de forzar el proceso. Cuando el proceso necesita ser forzado existen varios métodos dependiendo del microorganismo o las condiciones fisiológicas.

Los métodos son:

- ▶ Conjugación.
- ▶ Transfección.
- ▶ Biobalística.
- ▶ Electroporación.

Una vez transferida la molécula de ADN en la célula huésped comienza, la producción de la proteína es decir la expresión. La expresión es la producción de la proteína en células bacterianas o células de mamíferos que poseen el gen de interés. La expresión de un gen se realiza en dos procesos en transcripción y traducción. El inicio de la transcripción es con un promotor, donde el ARNm de interés se sintetiza en dirección 5' a 3' por acción de la ARN polimerasa. Para detener la síntesis se hace con secuencias repetidas invertidas en bacteria. La traducción inicia cuando los ribosomas se acoplan al ARNm en la secuencia

consenso y al encontrar el codón 5´AUG 3, inicia la síntesis de proteína con la metionina y termina con los codones UAA, UGA y UAG.

#### **4. MANUFACTURACIÓN PROCESO DE ESCALAMIENTO.**

Este paso incluye cuatro etapas:

- Inoculación
- Fermentación o Fase celular
- Purificación
- Formulación.

**Inoculación.** La industria debe garantizar la producción de una proteína recombinante, por esta razón se fabrican los bancos celulares (poseen la clona producida). El banco determina las pruebas de viabilidad, identidad, pureza y estabilidad. Entre las pruebas están: unidades formadoras de colonias (UFC), cuenta del número de copias del gen de interés, inmunodetección con anticuerpos específicos.

El banco celular consta de células hijas (provenientes de la célula huésped), las cuales crecen en un medio específico colocadas en frascos o placas celulares, para observar las características de crecimiento y así observar la viabilidad del producto.

Para determinar el medio en el que se va a desarrollar el banco celular depende de las características del sistema de expresión. Esta etapa conocida como *Upstream* consta de etapas de cultivo y recuperación del producto. Este medio específico depende de las características del sistema de expresión como: nutrientes, pH, temperatura, agitación, intercambio de gases para obtener un estado óptimo en las células que permitan obtener la mayor concentración de la proteína de interés.

**Fermentación o Fase celular.** Esta fase es para mantener el banco celular. Las células hijas producen proteínas tanto intracelular (vacuolas) como extracelular (células de mamífero) en el medio específico. Se debe

observar constantemente el medio en el que se desarrollan las células con la molécula recombinante, para remover las sustancias de desecho y así mantener la viabilidad y productividad del crecimiento celular, cuando la productividad de la proteína es óptima se inicia con la extracción de la misma a esto se le conoce como *Downstream*. En el sistema bacteriano la extracción se inicia centrifugando el medio, para formar una pasta celular, se desecha el sobrenadante y la pasta se vuelve a centrifugar. Así se rompe la pared celular, liberando la proteína de interés en el interior (vacuolas). En el sistema de células de mamífero, la proteína se encuentra en el medio de cultivo así que solo es recolectada periódicamente.

**Purificación.** Una vez obtenido el extracto donde se encuentra la proteína de interés, se procede a purificar la proteína. Existen diferencias entre el sistema de expresión bacteriano y el sistema de células de mamífero, para realizar la fase de purificación. Las técnicas de purificación que son utilizadas son las cromatografías, de afinidad, exclusión molecular, fase reversa e intercambio iónico; otras son los sistemas de ultrafiltración para la concentración del producto e intercambio de sales. La técnica de purificación a utilizar depende de las características físico-químicas, el estado en que se encuentra (líquido o sólido) y la cantidad requerida. En el sistema de expresión tanto bacteriano como de células de mamífero, la técnica más usada es la cromatografía líquida de alta definición HPLC (High-pressure liquid chromatography).

Las fases de fermentación y de purificación son muy importantes y delicadas, ya que la proteína puede sufrir modificaciones.

**Formulación.** Esta etapa es delicada y compleja; la formulación de una proteína es establecida por la estabilidad y los procesos de degradación de la misma. Para evitar que el producto biológico se degrade se usan agentes estabilizadores, soluciones amortiguadoras y minerales para estabilizar la proteína. El uso de diluentes como: agua estéril, solución salina o agua con

dextrosa al 5%, como parte de la formulación, ayudan a que no haya interacción con la proteína. Dependiendo del producto biológico es el agente estabilizador que se utiliza en la formulación, por ejemplo: el medicamento Filgrastim, factor de crecimiento para la proliferación y desarrollo de glóbulos blancos [Granulocyte colony stimulation factor (G-CSF)], el cual requiere como diluyente agua con dextrosa al 5% y no solución salina<sup>52</sup>.

La formulación para una proteína, no contiene agentes estabilizadores, ya que estos provocan interacciones con la proteína, causando inestabilidad y degradación, se coloca en un vial de vidrio y se somete al proceso de liofilización para su conservación. Existen diferentes causas para que una proteína se degrade, estas son: contaminación, temperatura (pueden provocar agregación o precipitación), agitación (cambio en la estructura de la proteína). El tipo de degradación de la proteína pueda sufrir se ve en el cuadro 6.

<b>Cuadro 6 Procesos de degradación de un producto biológico.<sup>36</sup></b>
<b>Precipitación.</b>
<b>Aglutinación/agregación.</b>
<b>Rompimiento de puentes disulfuro.</b>
<b>Mutación de aminoácidos.</b>
<b>Glicolisación/desglicosilación.</b>
<b>Conjugación.</b>
<b>Delección / adición de aminoácidos.</b>
<b>Reducción /oxidación.</b>
<b>Desamidación.</b>
<b>Proteolisis.</b>
<b>Inclusión de proteínas.</b>
<b>Variación en la secuencia de aminoácidos.</b>

## **5. CONTROL DE CALIDAD EN EL PRODUCTO FINAL.**

El proceso de Biotecnología de ADN recombinante es complejo y multifacético, ya que puede presentar muchas variaciones durante el proceso. El control de calidad del proceso debe ser muy estricto, ya que una mínima variación puede generar contaminación bacteriana o viral, o alguna reacción inmunológica a la proteína, generando un deterioro del producto. Para ello es indispensable validar el proceso para demostrar la seguridad del producto. Caracterizar cada una de las etapas para identificar puntos críticos, con base a la información obtenida se puede establecer el protocolo en donde se establecen los parámetros a evaluar. En la Fase de fermentación o fase celular se establecen los criterios de aceptación, los límites superiores e inferior. Mientras que en la fase de purificación se establecen como parámetros criterios de remoción de virus, endotoxinas, etc. Finalmente se realizan pruebas al producto para determinar sus características físicas, químicas y biológicas.

## ***ETAPA DE DESARROLLO PRECLÍNICO.***

Una vez obtenida la nueva molécula, que en el caso de medicamentos biotecnológicos es por ingeniería genética y haber realizado las pruebas de control de calidad donde se demuestra la identidad de la molécula tanto física, química y biológica y que no presenta ninguna modificación conforme a los requerimientos establecidos (Anexo I). El medicamento entra a la siguiente fase.

En la etapa de Desarrollo preclínico, se realizan estudios orientados a dar soporte para la autorización de ensayos clínicos. Dependiendo del tipo de medicamento (químico, biológico o biotecnológico), o del tipo de paciente (niños adolescentes, adultos, adultos mayores), patologías (oncológicas, para SNC, renales, etc.) y la distribución geográfica (principalmente por los requerimientos regulatorios), son el tipo de pruebas requeridas.

Se realizan pruebas para determinar que el medicamento esté caracterizado químicamente físicamente y biológicamente, se debe conocer la pureza, el contenido de impurezas, hacer estudios microbiológicos, estudios de estabilidad y un método analítico que permita emitir un certificado de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL's), asociado al lote a utilizar. Se realizan los estudios Farmacológicos, Toxicológicos (Reproducción, mutagénesis y carcinogénesis) y el estudio de Adsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME).

Los estudios farmacológicos permiten dar resultados acerca de los efectos del medicamento a distintos niveles (celular, molecular, bioquímico, tisular, órgano, etc.), perfil de la actividad sobre sistemas y aparatos, y efecto principal y efectos secundarios.

Los estudios de toxicidad permiten establecer el Índice Terapéutico (IT), Índice de Seguridad (IS), la Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), etc.

En los estudios ADME: Absorción (biodisponibilidad, sitio de adsorción), Metabolismo (volumen de Distribución, unión a proteínas, fijación a tejidos, etc.), Metabolismo (vía metabólica en donde, el medicamento es transformado en

compuesto más fácil para su posterior eliminación) y Excreción (eliminación del medicamento del organismo, ya sea renal, biliar o pulmonar.)

La finalidad de esta etapa es garantizar la eficacia y seguridad del medicamento en animales “in vivo” o sistemas celulares “in vitro”. Ver Figura 32.

Cuando un medicamento aprueba las pruebas durante la fase preclínica se presenta un dossier (expediente) ante las agencias regulatorias, en México la Secretaría de Salud (SSA) a través de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), en el cual se describe detalladamente los resultados obtenidos en los estudios preclínicos; esto con la finalidad de obtener la aprobación gubernamental para realizar los ensayos clínicos.



Figura 32. Etapa Desarrollo preclínico.<sup>5</sup>

## **ETAPA DE DESARROLLO CLÍNICO.**

En esta fase la finalidad es iniciar la investigación en humanos. Para el estudio clínico se requiere de individuos que participen en el estudio (sujetos experimentales), los cuales son seleccionados conforme a los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión: edad, género, definir características de la patología a estudiar.

Criterios de exclusión: embarazadas, niños, ancianos.

Se requiere de un diseño donde, tenga un grupo control o referencia, con el cual se puede comparar los resultados contra el grupo experimental; el grupo control utiliza el medicamento de referencia o placebo.

Existen tres tipos de estudio:

<b>ESTUDIO</b>	
<b>Abierto</b>	El paciente y el clínico o responsable de llevar el estudio, conocen el tratamiento.
<b>Simple ciego</b>	El responsable del estudio conoce el tratamiento y el paciente no.
<b>Doble ciego</b>	El responsable del estudio y el paciente no conocen el tratamiento.

Una vez establecido los individuos a participar en el estudio y el diseño del mismo, se requiere que se presente un documento conocido como consentimiento informado antes de iniciar el estudio. En este documento el sujeto o sus representantes autorizan su participación y contiene:

- I. El propósito del estudio.
- II. Procedimientos experimentales.

- III. Descripción de riesgos y beneficios anticipados.
- IV. Procedimientos alternativos.

Finalmente comienza el estudio, el cual se desarrolla en cuatro Fases:

**Fase I.** Los estudios son realizados principalmente en un pequeño grupo de voluntarios sanos (20-80 individuos), por investigadores capaces de evaluar datos farmacológicos y toxicológicos. El estudio está diseñado a simple ciego, donde los pacientes desconocen el tratamiento.

El principal objetivo es ver los efectos farmacológicos, detección de reacciones adversas, dosis máxima tolerada, detectar signos de toxicidad etc. El estudio puede durar de 6 meses hasta un año.

**Fase II.** Una vez terminada la Fase I con resultados confiables, comienza la siguiente donde, los sujetos experimentales son pacientes enfermos. El clínico debe estar familiarizado con la patología que se está tratando, y diseña con frecuencia un estudio ciego. Normalmente se divide en dos grupos: uno donde se le administra el medicamento y al otro el medicamento de referencia o placebo.

Los estudios en esta fase son aleatorizados, su finalidad es ver las acciones farmacológicas, posibles efectos terapéuticos, detección de reacciones adversas, también se determina el rango de la dosis terapéutica para la siguiente fase; su duración puede ser de dos a tres años.

**Fase III.** En esta fase, los ensayos clínicos se realizan a un grupo grande de pacientes. Su finalidad es obtener datos confiables que sustenten la eficiencia y seguridad del medicamento con respecto al control o medicamento de referencia. Se diseñan estudios doble ciego y cruzado. La duración de estos estudios es alrededor de tres a cinco años, sobre todo si el tratamiento es dirigido para retardar una enfermedad crónica.

El proceso completo de los ensayos clínicos se lleva a cabo conforme a las guías internacionales Conferencia Internacional de Armonización (ICH) su cumplimiento asegura todo el proceso, desde el diseño hasta la documentación, análisis

estadístico y farmacovigilancia. En México la COFEPRIS las toman como guías para normar y regular los estudios clínicos.

**Fase IV.** Esta fase se refiere a la vigilancia continua de la seguridad del nuevo medicamento en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes. Los seguimientos se conocen como estudios de farmacovigilancia (Ver Figura 33).

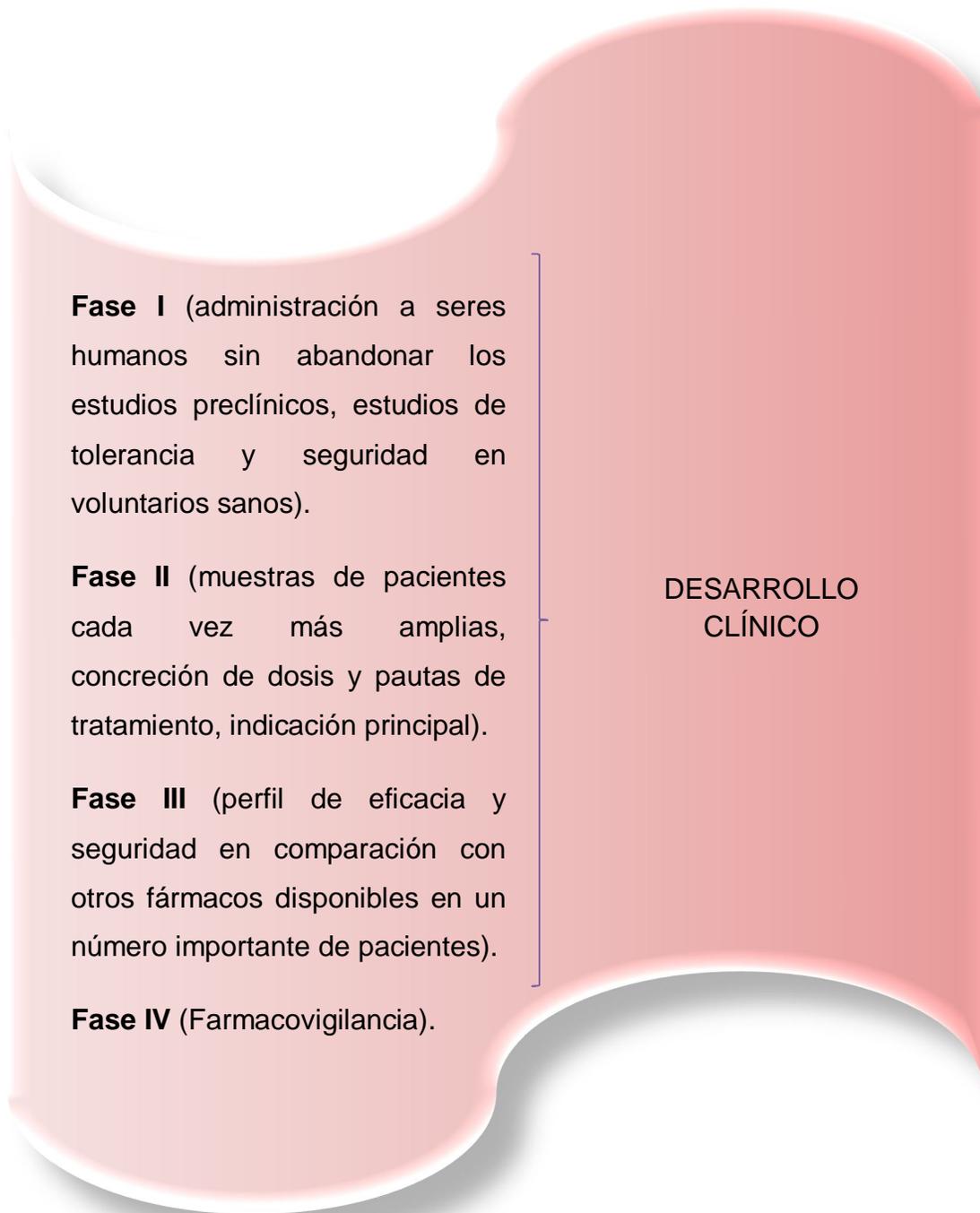


Figura 33. Etapa Desarrollo clínico.<sup>5</sup>

## ***ETAPA DE APROBACIÓN Y REGISTRO.***

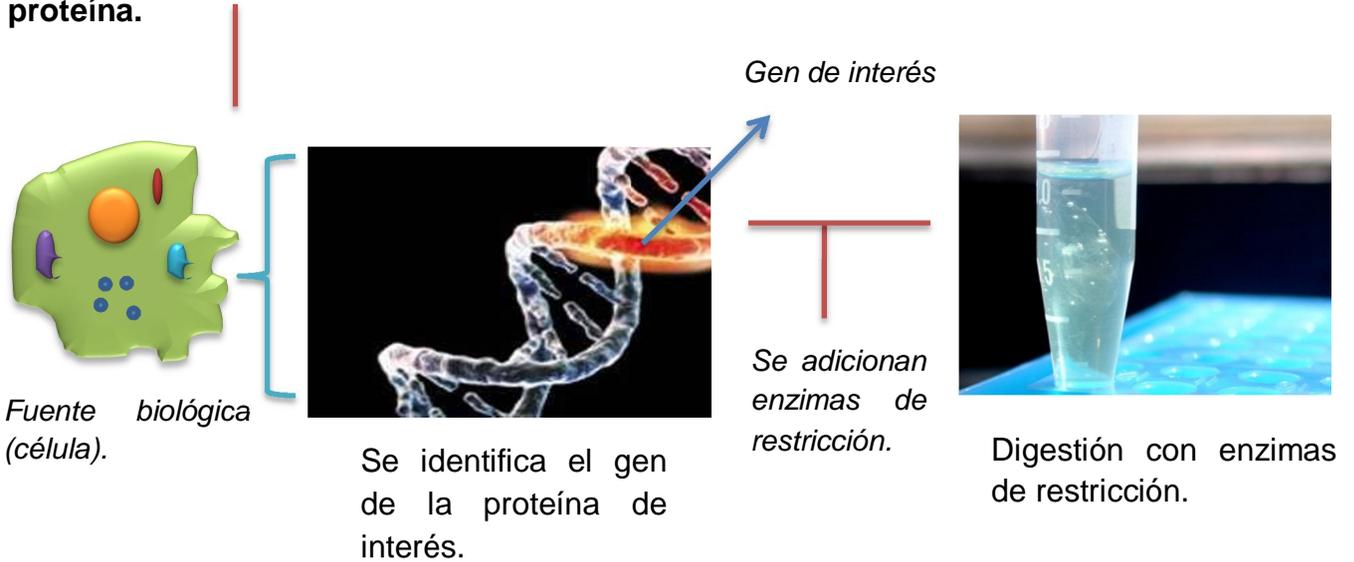
Una vez concluidos los estudios clínicos (FASE I-IV) y su previa aprobación la agencia reguladora, en México la SSA y la COFEPRIS otorgan el registro sanitario conforme a los requisitos establecidos. Para medicamentos biotecnológicos en el Artículo 122 de la Ley General de Salud y el Artículo 177. Los estudios que continúan, una vez otorgado el registro sanitario, son los estudios de farmacovigilancia. La finalidad de estos estudios es garantizar la seguridad de la población, una vez que el medicamento sale al mercado.

En la figura 34 se puede ver un diagrama para la fabricación de un medicamento biotecnológico.

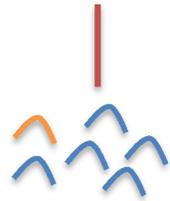
**Figura 34. DIAGRAMA DE FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO**<sup>5, 39, 40, 41, 42,43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60,</sup>

61, 62, 63, 64, 65,66.

**Identificación, localización y aislamiento del gen de la proteína.**



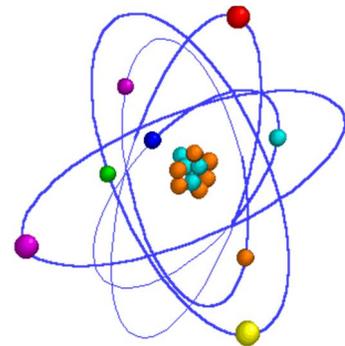
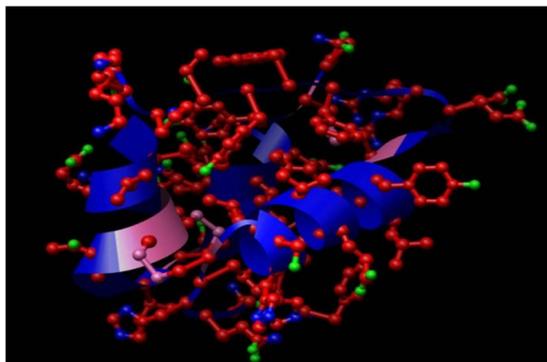
*Centrifugación para quitar restos celulares.*



*Fragmentos de ADN generados posteriormente a la digestión.*

Se estudia las características biológicas del gen (estructura tridimensional, secuencia de genes, propiedades químicas, etc.), usando modelos moleculares.

Met	Thr	His	Asn	Glu	Phe	Val	Trp	Cys	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



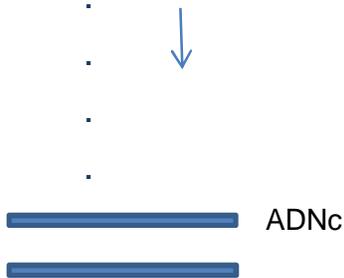
ARNm del gen

Transcriptasa  
inversa

AUG ACA CAU AAC GGC UUC GUA UGG UGU GAA

Si posee las características deseadas, se aísla el gen y se construye una biblioteca de ADNc a partir del ARNm.

ARNm



Biblioteca de ADNc

Adición de una sonda  
para rastrear la  
secuencia del gen.



Electroforesis en gel.

Se selecciona el sistema de expresión antes de iniciar la clonación del gen.

Sistema de expresión:

- Células de mamífero.
- Células bacterianas.

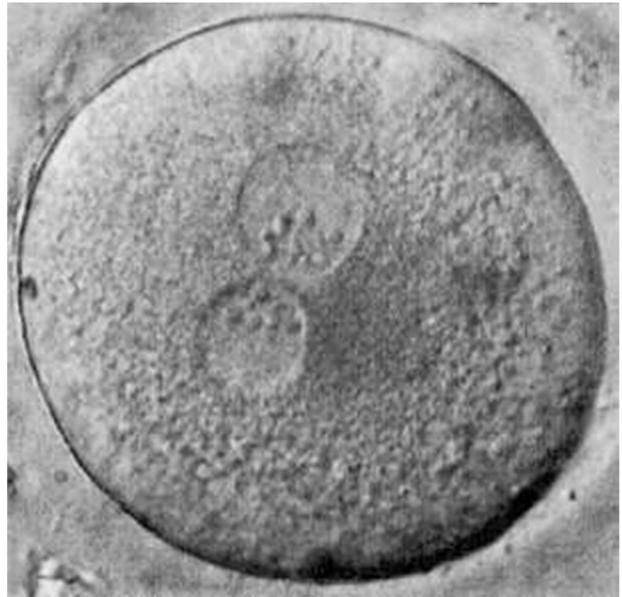
**Clonación y expresión del gen.**

Se realizan pruebas de identidad y esterilidad para verificar que el sistema de expresión no este contaminado.

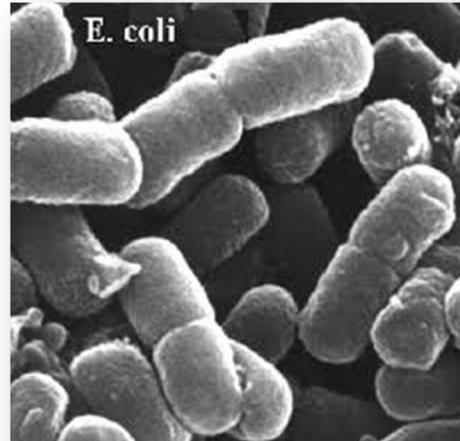
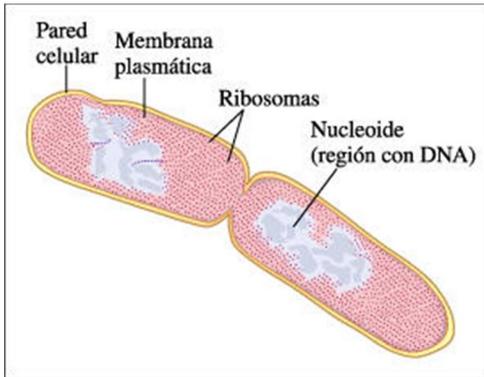


*Sistema de expresión.*

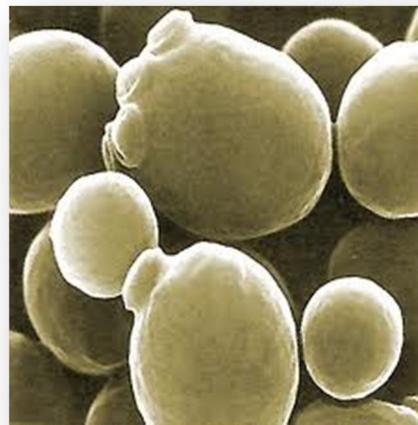
*Célula de mamífero.*



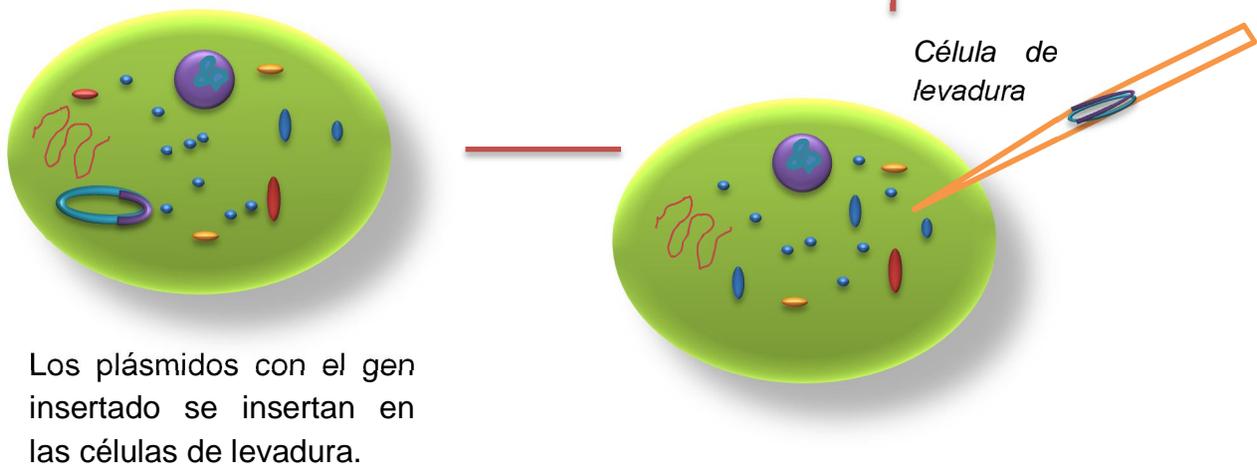
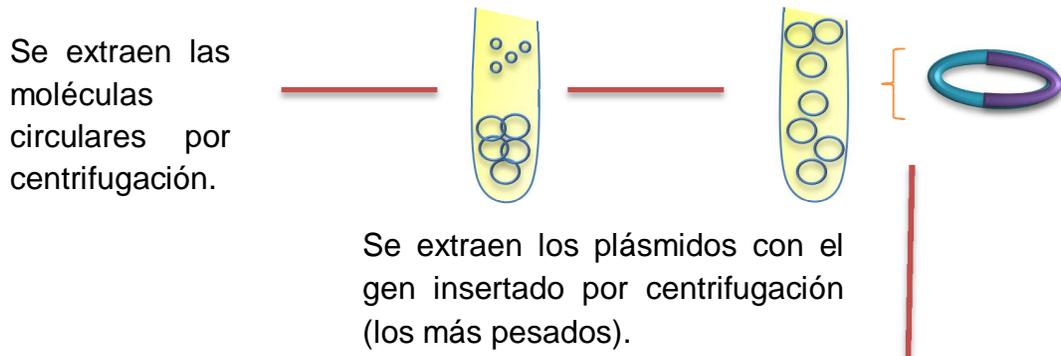
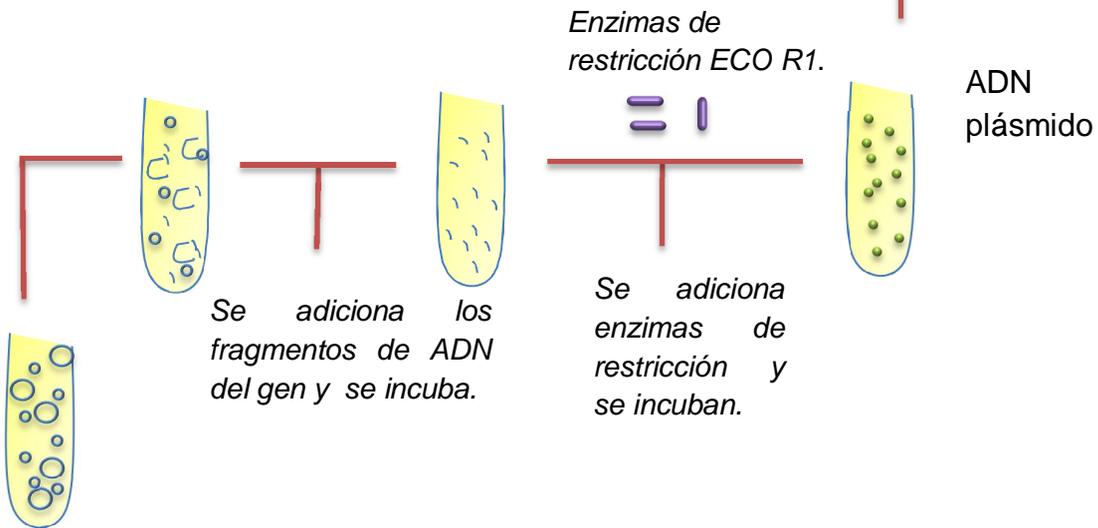
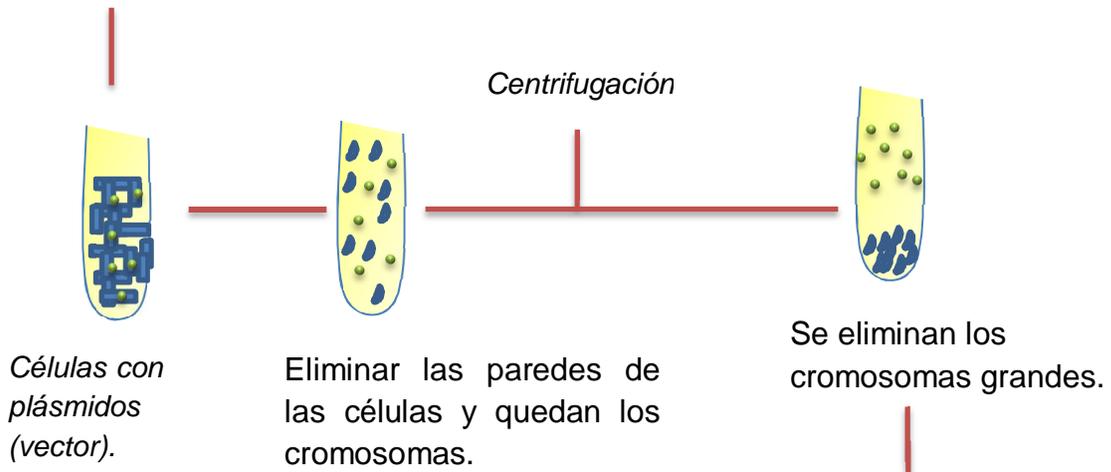
*Célula bacteriana.*

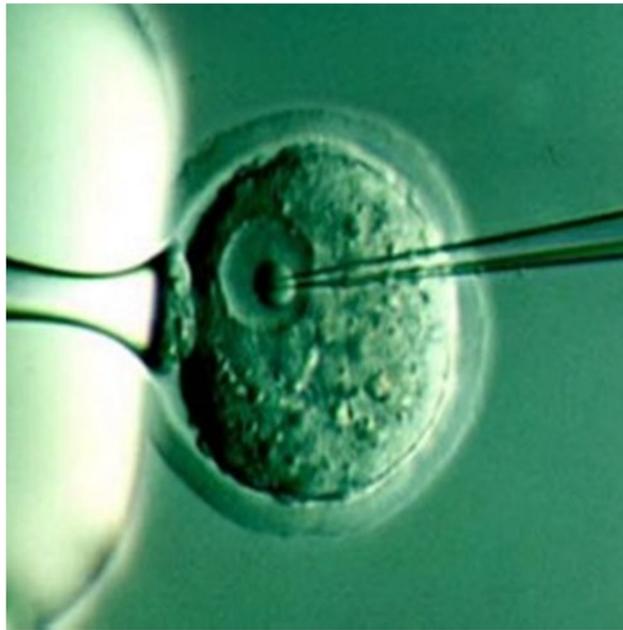


*E. coli*



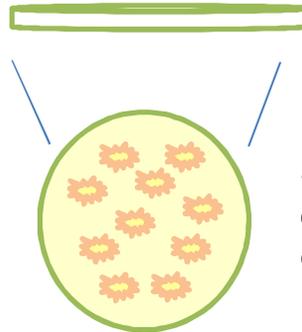
*S. cerevisiae*





Inserción del gen en la célula de levadura en microscopía.

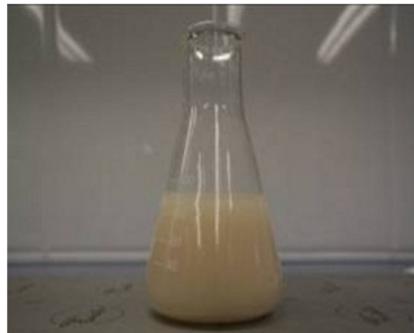
Las células de levadura con el plásmido insertado son cultivadas en placas de agar.



Se crea el banco celular. Es decir crecen colonias (clonas) en el medio de cultivo.

A partir del banco celular, se lleva la producción a escala de la proteína.

**Producción, extracción y purificación de la proteína.**



*Crecimiento de las células de levadura por fermentación.*

Matraz Fermentador de siembra.



Comienza la extracción cuando la productividad de la proteína es óptima.

*Recolección (extracción).*

Matraces fermentadores de producción (se observa constantemente el medio para mantener la viabilidad y productividad del crecimiento celular).

*Filtración a través de membrana.*

Se purifica la proteína a través de una membrana, cuyo tamaño de poro es aproximadamente  $0.45 \mu$ .



Se coloca un embudo de filtración estéril, para evitar contaminación de la proteína.



La filtración se usa para romper la pared celular de las células.



Terminando la filtración, se traspara el sobrenadante a tubos eppendorf para comenzar la centrifugación del producto.

Se forma una pasta celular, la cual se suspende en agua estéril. Se le añade sulfato de amonio para que las proteínas precipiten



La centrifugación es para quitar restos celulares (sobrenadante).

Se forma una pasta celular, la cual se resuspende y las proteínas se precipitan con sulfato de amonio.

El precipitado se resuspende.

Centrifugar para quitar restos celulares.

Finalmente el producto pasa por cromatografía para separar la proteína.

Dependiendo de las características de la proteína es el tipo de técnica cromatográfica que se va a utilizar.



*Cromatografía de intercambio iónico.*



*Cromatografía de exclusión molecular.*



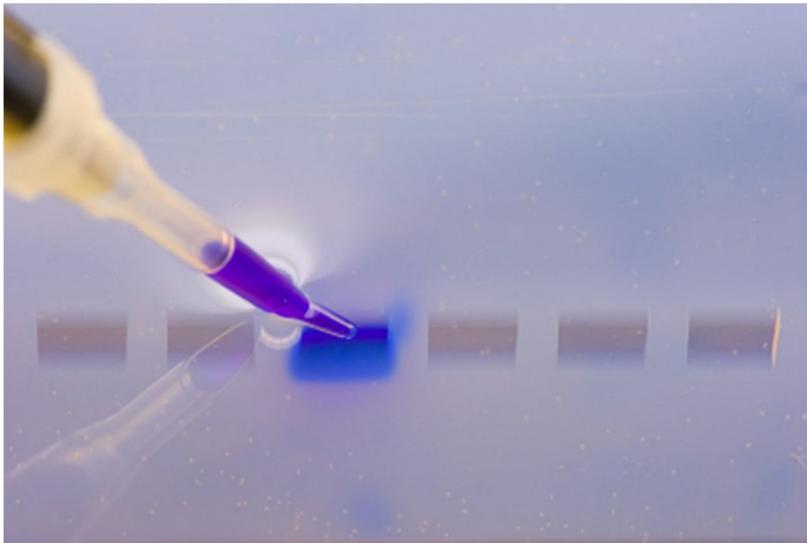
*Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).*

Proteína purificada colocada en viales de vidrio estériles.

A un vial se adiciona enzimas de restricción.

Se fragmenta la proteína, para ser analizada.

*Electroforesis en gel de poliacrilamida.*

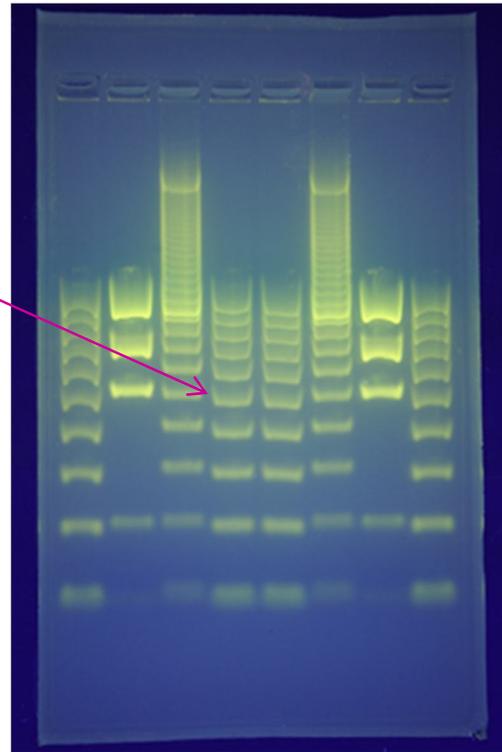


Se colocan los fragmentos de la proteína en el carril.

La proteína se pasa en un gel de electroforesis para separarla y ver su ubicación.

Proteína

*Gel de poliacrilamida  
teñido e iluminado  
con luz ultravioleta.*



### Formulación.

*Adicionar agentes estabilizadores.*



Se estabiliza la proteína con agentes estabilizadores, preservadores y otros.

*Agua estéril*



*Solución salina*

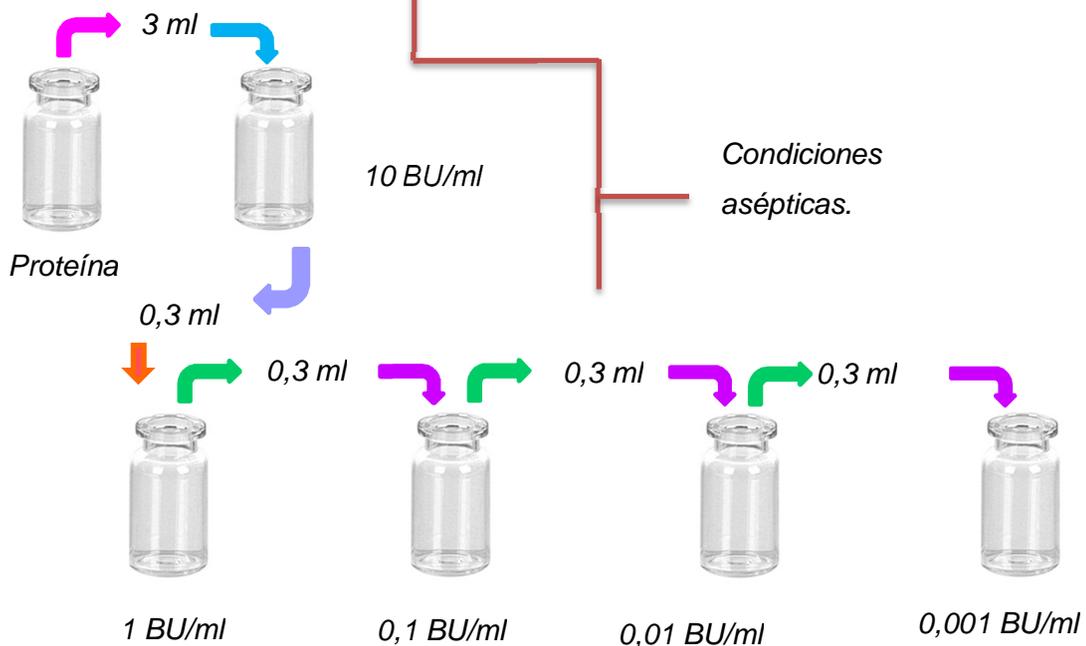


El agente empleado para estabilizar la proteína depende de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la misma, para evitar su degradación.

Se procesa para realizar el medicamento.

Se ajusta la concentración de la proteína.

A partir de una la disolución control se hacen las disoluciones, dependiendo la concentración requerida para el medicamento.



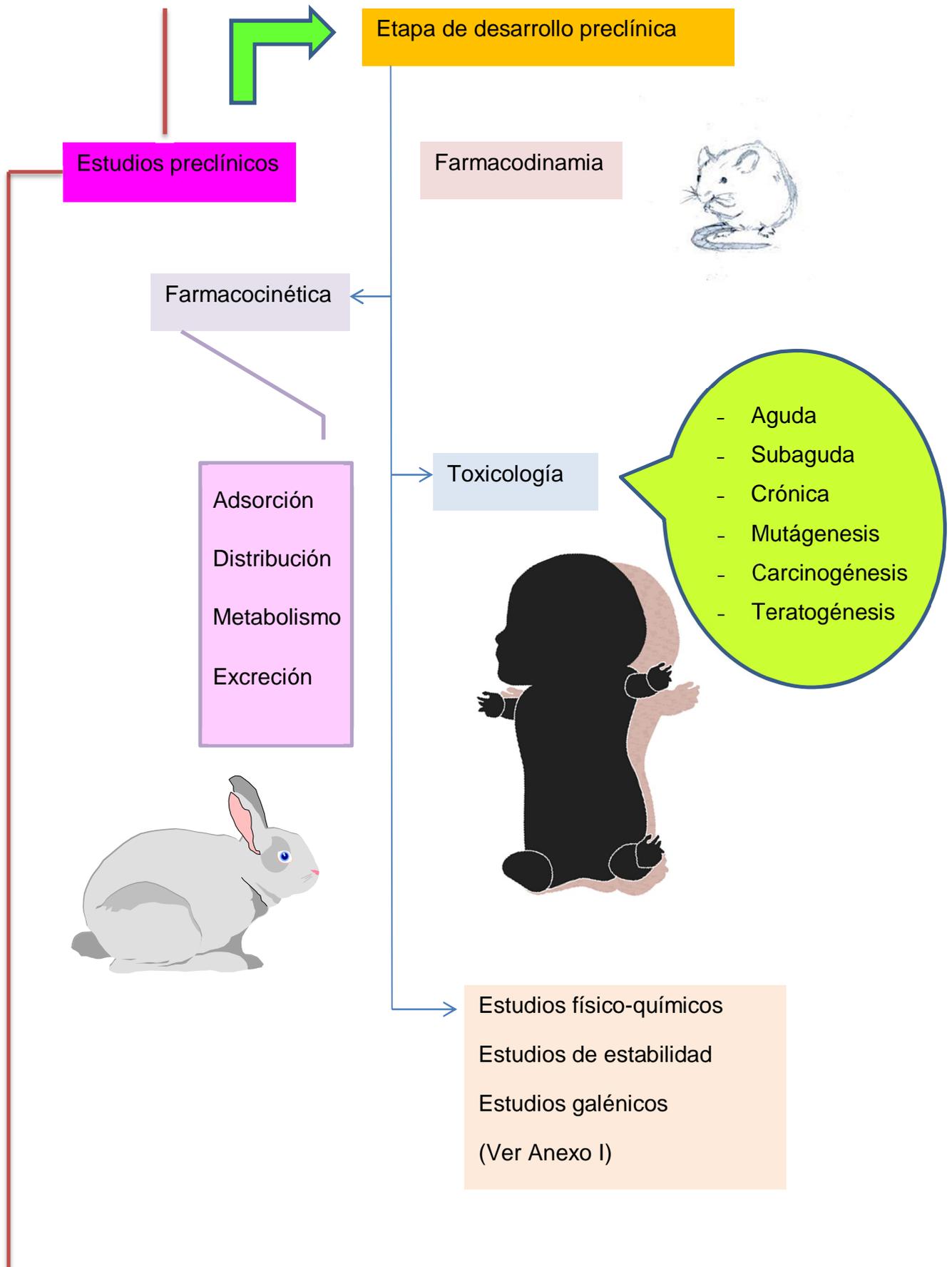
Una vez obtenida la concentración, pasa el producto a acondicionamiento.

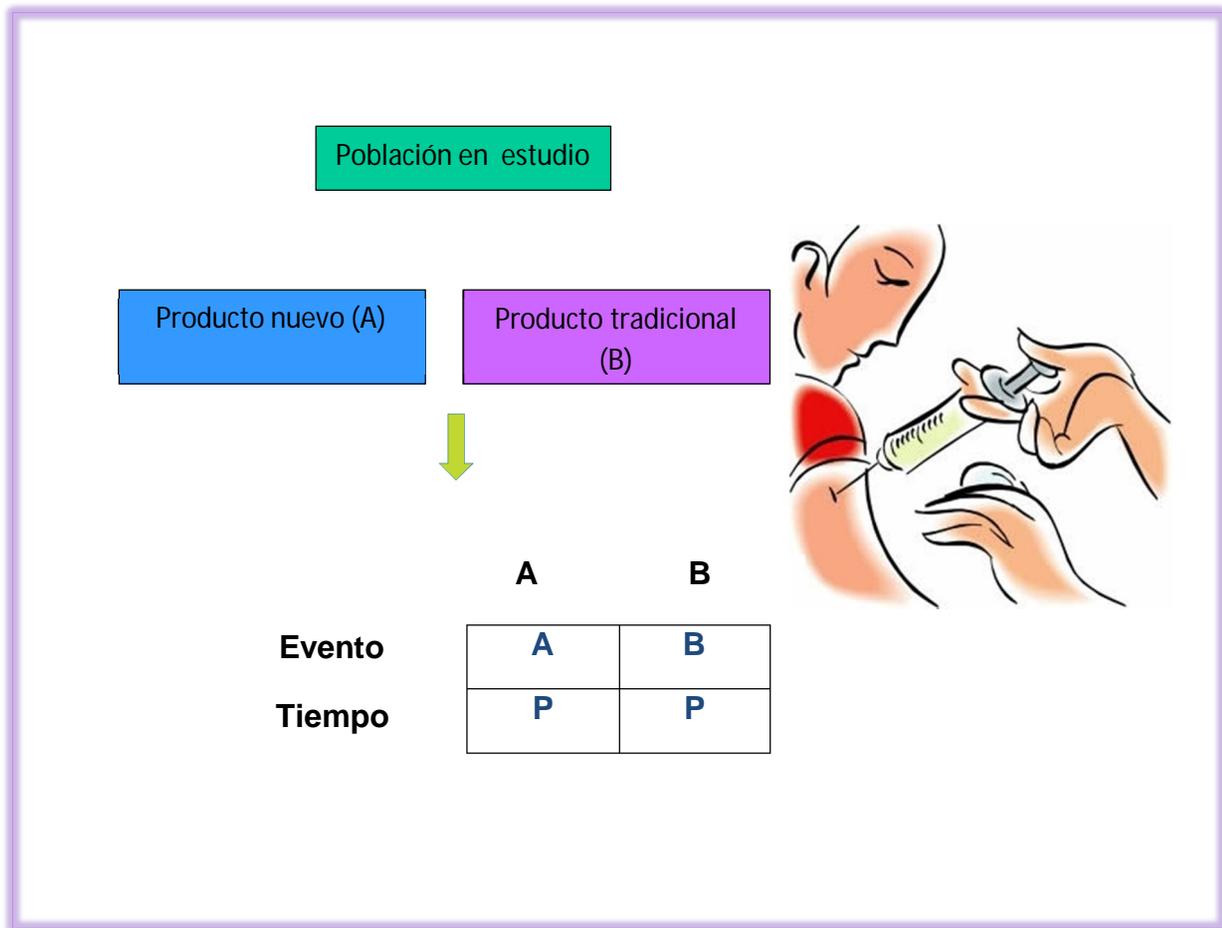
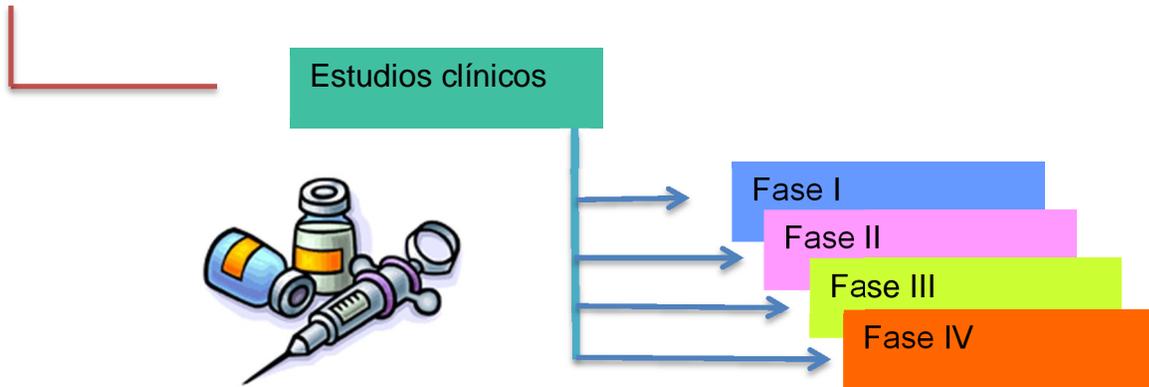


El producto se somete a pruebas de control de calidad. (Ver el Anexo I).

*Estudios preclínicos.*  
*Estudios clínicos.*

**Estudios.**





**PRODUCTO TERMINADO.  
(VENTA)**

## CONCLUSIONES.

La Biotecnología tiene su crecimiento en el desarrollo y la aplicación en el área farmacéutica, a partir de la Segunda Guerra Mundial, con el primer antibiótico (penicilina) y posteriormente a partir del descubrimiento de la forma de doble hélice del ADN.

El desarrollo de técnicas de ADN recombinante ofrece nuevas oportunidades para la investigación, ya que simplifica la obtención de grandes cantidades de ADN que codifica genes específicos, y facilita las investigaciones de la organización, estructura y expresión génicas.

Esta metodología ha dado un impulso en la producción de proteínas y otros componentes en la medicina y en la industria farmacéutica, suministrando un gran número de productos al mercado. Por ejemplo hormonas (insulina, la hormona del crecimiento), cofactores de la coagulación, productos sanguíneos (agentes trombolíticos), factores estimuladores de células (eritropoyetina), anticuerpos (Mabs), vacunas etc.

Los medicamentos obtenidos por biotecnología son una clase terapéutica con características diferenciales muy determinadas en relación con los medicamentos convencionales que se obtienen por síntesis química o los que se extraen de productos naturales; son más específicos, precisos, predecibles y con menos efectos secundarios.

Las nuevas disposiciones legales permiten tener mayor control, confiabilidad y mayor calidad en el proceso de fabricación, y acondicionamiento en los medicamentos biotecnológicos.

Las etapas de desarrollo de un medicamento obtenido por biotecnología, son diferentes a la de un medicamento obtenido por síntesis química. Las etapas comprenden desde determinar las características físicas, químicas y biológicas de la proteína antes de entrar en el proceso y al salir del mismo.

La etapa de investigación básica de un producto biotecnológico, es muy delicada y compleja, cualquier variación en el equipo o en el proceso puede provocar cambios en la molécula, que puede variar en su actividad biológica o su degradación.

Cualquier variación en el proceso de fabricación del medicamento biotecnológico, puede producir un medicamento con propiedades distintas y por ende, variaciones en su efecto sobre el organismo, que incluso pueden llegar a ser fatales para los pacientes.

El desarrollo de estos productos ha crecido debido a su importancia en la prevención, diagnóstico, control y tratamiento de enfermedades. Su regulación enfrenta nuevos desafíos en comparación con la regulación de medicamentos convencionales obtenidos por síntesis química.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Artículo 2 de [Convenio sobre diversidad biológica](#). Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Río de Janeiro, 1992.
2. Declaración de la FAO sobre biotecnología. [www.fao.org](http://www.fao.org), citado el [22de enero del 2012](#).
3. <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=151> citado el [22de enero del 2012](#).
4. Farmacopea de los Estados Unidos de América, *Advertencia y requisitos generales USP, aplicables a las normas, pruebas, valoraciones y otras especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos*, Volumen 1, 2007, Pág. 19.
5. Gennaro R. Alfonso, Remington; *Farmacía*, Editorial Médico Panamericana, 20° Edición 2003; Tomo1. Pg. (s) 39, 105, 1098-1116.
6. Swarbrick James, *Enciclopedia of Pharmaceutical Technology*; Infarma healthcare, Third Edition 2007, Volume 1; Pg. (s) 258-309.
7. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2011/2/WC500099907.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2011/2/WC500099907.pdf), citado el [25 de enero del 2012](#).
8. <http://www.emea.europa.eu>, citado el [25 de enero del 2012](#).
9. Marcos Timón y Ruiz, Sol “Bases regulatorias para los medicamentos de origen biotecnológico”, en *Economía de la salud*, Volumen 6, Número 6, Año 2007, p.349-350.
10. Begoña Calvo\*Begoña Calvo\* y Leyre Zúñiga, Medicamentos Biotecnológicos: Requisitos Exigidos para el Desarrollo y Aprobación de Biosimilares, Vol. 21(6), 125-132 (2010)
11. ICH Q5C: *Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products*. <http://www.ich.org/> (1995). citado el [25 de enero del 2012](#).

12. ICH S6: *Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals*. Jul 1997 <http://www.ich.org/> (1997). citado el 25 de enero del 2012
13. ICH Q6B. CPMP/ICH/365/96 – adoptada marzo 99 (Topic Q6B. Step 4 *Note for Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/ Biological Products*). citado el 25 de enero de 2012.
14. ICH Q5E. *ICH harmonised tripartite guideline. Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process*. <http://www.ich.org/> (2004), citado el 25 de enero del 2012.
15. <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/RegulatoryProcedureManual/ucm179275.htm> citado el 25 de enero del 2012.
16. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm079436.htm> citado el 25 de enero de 2012.
17. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_joomlabook&Itemid=260](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_joomlabook&Itemid=260) citado el 25 de enero del 2012.
18. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&task=view&id=5770&Itemid=4162](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=5770&Itemid=4162) citado el 25 de enero de 2012.
19. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&task=view&id=4446&Itemid=513&lang=es](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=4446&Itemid=513&lang=es) citado el 25 de enero de 2012.
20. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualityguidelines.html> citado el 25 de enero de 2012.
21. <http://www.cofemer.gob.mx/expediente/v99/B001003981.pdf> citado el 25 de enero de 2012.
22. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ris.html> citado el 25 de enero de 2012.
23. [http://www.convet.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=268&Itemid=73&lang=es](http://www.convet.net/index.php?option=com_content&view=article&id=268&Itemid=73&lang=es) citado el 25 de enero del 2012 citado el 25 de enero de 2012

24. [http://lnx.futuremedicos.com/Revista\\_future/Articulos&Trabajos/Basicas/bq/clonacion\\_DNA.htm](http://lnx.futuremedicos.com/Revista_future/Articulos&Trabajos/Basicas/bq/clonacion_DNA.htm) citado el 12 de febrero de 2012.
25. <http://www.arrakis.es/~ibrabida/viginsercion.html> citado el 13 de febrero de 2012.
26. <http://pht.cl/safer/tecnologia> citado el 13 de febrero de 2012.
27. [http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Basemol/base\\_molecular\\_de\\_la\\_herencia.htm](http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Basemol/base_molecular_de_la_herencia.htm) citado el 13 de febrero de 2012.
28. <http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/cosmid-pJB8.html> citado el 13 de febrero de 2012
29. [http://www.google.com.mx/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Gel\\_electrophoresis\\_2.jpg&imgrefurl=http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gel\\_electrophoresis\\_2.jpg&h=1200&w=1600&sz=446&tbnid=VxjeFheRF0I0M:&tbnh=90&tbnw=120&prev=/search%3Fq%3Dgel%2Belectroforesis%26tm%3Disch%26tbo%3Du&zoom=1&q=gel+electroforesis&docid=EHWe\\_rnaFMoimM&hl=es&sa=X&ei=f8ohT8OMHpSAsqLs9PWGCQ&sqi=2&ved=0CDcQ9QEwAw&dur=5674](http://www.google.com.mx/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Gel_electrophoresis_2.jpg&imgrefurl=http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gel_electrophoresis_2.jpg&h=1200&w=1600&sz=446&tbnid=VxjeFheRF0I0M:&tbnh=90&tbnw=120&prev=/search%3Fq%3Dgel%2Belectroforesis%26tm%3Disch%26tbo%3Du&zoom=1&q=gel+electroforesis&docid=EHWe_rnaFMoimM&hl=es&sa=X&ei=f8ohT8OMHpSAsqLs9PWGCQ&sqi=2&ved=0CDcQ9QEwAw&dur=5674) citado el 25 de enero de 2012.
30. [http://www.google.com.mx/imgres?q=southern+%26+northern+blot&um=1&hl=es&sa=N&rlz=1R2WZPG\\_esMX448&biw=1366&bih=641&tbnid=isch&tbnid=4uAERP\\_rEcitadoel7Y3H8zm2dRBM&imgurl=http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/images/blotting\\_clip\\_image001.gif&w=600&h=400&ei=0d4kT9usCej5sQKk4KmMAg&zoom=1&iact=hc&vpx=179&vpy=155&dur=174&hovh=183&hovw=275&tx=136&ty=123&sig=116332333039749505145&page=1&tbnh=131&tbnw=196&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:0,s:0](http://www.google.com.mx/imgres?q=southern+%26+northern+blot&um=1&hl=es&sa=N&rlz=1R2WZPG_esMX448&biw=1366&bih=641&tbnid=isch&tbnid=4uAERP_rEcitadoel7Y3H8zm2dRBM&imgurl=http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/images/blotting_clip_image001.gif&w=600&h=400&ei=0d4kT9usCej5sQKk4KmMAg&zoom=1&iact=hc&vpx=179&vpy=155&dur=174&hovh=183&hovw=275&tx=136&ty=123&sig=116332333039749505145&page=1&tbnh=131&tbnw=196&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:0,s:0) citado el 25 de enero de 2012
31. <http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/herramgen/recomb.pdf> citado el 05 de febrero de 2012
32. <http://oldigm0910.wikispaces.com/San+Jose+Ana> citado el 03 de marzo de 2012.

33. Solari Alberto Juan, *Genética humana fundamentos y aplicaciones en medicina*, 3ª Edición, Editorial Medica Panamericana, 2007.
34. Champe, *Bioquímica*, 3ª Edición, Editorial Mc Graw-Hill, Interamericana 2006, Pág. (s) 507-528.
35. [http://es.123rf.com/photo\\_7823781\\_cargar-una-muestra-en-un-gel-para-electroforesis.html](http://es.123rf.com/photo_7823781_cargar-una-muestra-en-un-gel-para-electroforesis.html) citado el 03 de marzo de 2012.
36. Swarbrick James, *Enciclopedia of Pharmaceutical Tecnology*, Third Edition, 2007, Volumen 1, Pp. 258-263.
37. Brown T.A., *Gene cloning and analysis an Introduction*, Fifth Edition, Blackwell Publishing, 2006, Pp. 5-22.
38. Harper, *Bioquímica Ilustrada*, Editorial El Manual Moderno, 17º Edición, 2007, Pp. 667-669.
39. <http://wwwdesedadesedas.blogspot.mx/2009/07/trabajodelamolecula-de-adn.html>, citado el 30 de abril de 2012.
40. <http://eduardoochoa.com/joomla/content/view/503/111/1/1/>, citado el 30 de abril de 2012.
41. [http://www.rsc.org/Publishing/ChemScience/Volume/2009/07/green\\_HPLC.asp](http://www.rsc.org/Publishing/ChemScience/Volume/2009/07/green_HPLC.asp) citado el 30 de abril de 2012.
42. [http://es.123rf.com/photo\\_614070\\_medico-en-la-colocacion-detubos-de-ensayo-por-centrifugacion.html](http://es.123rf.com/photo_614070_medico-en-la-colocacion-detubos-de-ensayo-por-centrifugacion.html) citado el 30 de abril de 2012.
43. [http://www.google.com.mx/imgres?q=cromatografia+de+exclusion+molecular&start=309&um=1&hl=es&rlz=1R2WZPG\\_esMX448&biw=1525&bih=690&addh=36&tbnid=VCXsT4AhEB7EM:&imgrefurl=http://avibert.blogspot.com/2010/01/recuperaciondeproductos.html&docid=lvOxIWq\\_rYNVWM&imgurl=http://4.bp.blogspot.com/\\_1zWhg0gVkul/S0qn64as\\_BI/AAAAAAAAABiI/DCj9V34NqTA/s200/imagen%252Bmolecular.jpg&w=200&h=134&ei=id7GT6qVNoqE8QTXpvHwCw&zoom=1&iact=hc&vpx=1098&vpy=246&dur=201&hovh=107&hovw=160&tx=42&ty=58&sig=116332333039749505145&page=12&tbnh=107&tbnw=160&ndsp=27&ved=1t:429,r:11,s:309,i:87](http://www.google.com.mx/imgres?q=cromatografia+de+exclusion+molecular&start=309&um=1&hl=es&rlz=1R2WZPG_esMX448&biw=1525&bih=690&addh=36&tbnid=VCXsT4AhEB7EM:&imgrefurl=http://avibert.blogspot.com/2010/01/recuperaciondeproductos.html&docid=lvOxIWq_rYNVWM&imgurl=http://4.bp.blogspot.com/_1zWhg0gVkul/S0qn64as_BI/AAAAAAAAABiI/DCj9V34NqTA/s200/imagen%252Bmolecular.jpg&w=200&h=134&ei=id7GT6qVNoqE8QTXpvHwCw&zoom=1&iact=hc&vpx=1098&vpy=246&dur=201&hovh=107&hovw=160&tx=42&ty=58&sig=116332333039749505145&page=12&tbnh=107&tbnw=160&ndsp=27&ved=1t:429,r:11,s:309,i:87) citado el 30 de abril de 2012.

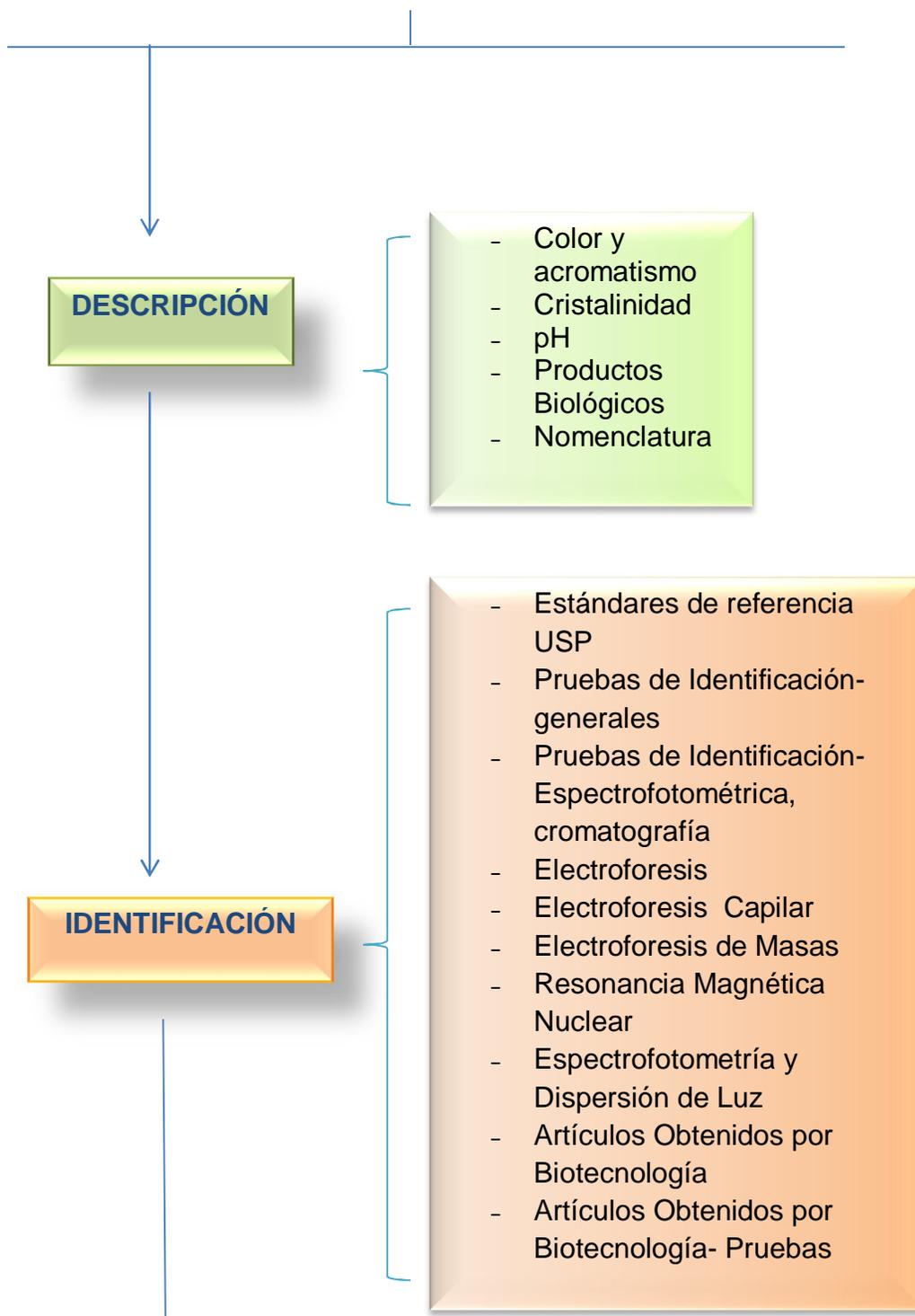
44. <http://www.trabajosquimica3cmelissa.blogspot.mx/2011/05/paraempezar-resumen.html> citado el 30 de mayo de 2012
45. <http://ceetelecomunicaciones.blogspot.mx/2011/02/molecula.html>, citado el 30 de mayo de 2012.
46. <http://panvi11hotmailcom.blogspot.mx/>, citado el 30 de mayo de 2012.
47. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=5012>, citado el 30 de mayo de 2012.
48. <http://investigacion.us.es/noticias/344>, citado el 30 de mayo de 2012.
49. <http://mx.globedia.com/iran-presenta-medicamentos-biotecnologicos> citado el 30 de mayo de 2012.
50. <http://www.amqueretaro.com/nsalud.php?id=823> citado el 30 de mayo de 2012.
51. Klug. W.S., Cummings M.R., Conceptos de Genética, Editorial Prentice Hall, Quinta Edición, Pp. 453-475.
52. [http://pi.amgen.com/united\\_states/neupogen/neupogen\\_pi\\_hcp\\_english.pdf](http://pi.amgen.com/united_states/neupogen/neupogen_pi_hcp_english.pdf) citado el 14 de junio de 2012.
53. [http://www.fisicanet.com.ar/biologia/introduccion\\_biologia/ap12\\_aminocidos\\_y\\_proteinas.php](http://www.fisicanet.com.ar/biologia/introduccion_biologia/ap12_aminocidos_y_proteinas.php) citado el 14 de junio de 2012.
54. [http://es.wikipedia.org/wiki/Hip%C3%B3tesis\\_del\\_ciclo](http://es.wikipedia.org/wiki/Hip%C3%B3tesis_del_ciclo) citado el 14 de junio de 2012.
55. <http://www.vanguardia.com.mx/adncomodiscoduroyaesposible1294180.html> citado el 14 de junio de 2012.
56. <http://www.taringa.net/posts/cienciaeducacion/11283038/TenemosGenes-Extraterrestres.html> citado el 14 de junio de 2012.
57. <http://www.tecrom.com/es/catalog/controldecalidadmicrobiol%C3%B3gica-para-coliformes-totales-coniformes-fecales-bacterias-total> citado el 14 de junio de 2012.
58. <http://www.dynamicadsorbents.com/spanishweb/flashchromatography.htm> citado el 14 de junio de 2012.

59. <http://www.rubilabor.com/productosyservicios/categoria/reactivospara-gentica-molecular/26/purificacin-y-extraccin/195/> citado el 21 de junio de 2012.
60. <http://my.opera.com/OSIRISMELISA40/blog/?startidx=110> citado el 21 de junio de 2012.
61. <http://biologochacaloso.blogspot.mx/2012/06/institutotecnologicodecd-altamirano.html> citado el 21 de junio de 2012.
62. <http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/ce-lular/electroforesis.html> citado el 21 de junio de 2012.
63. [http://www.google.com.mx/imgres?q=southern+blot&um=1&hl=es&sa=N&rlz=1R2WZPG\\_esMX448&biw=1366&bih=641&tbm=isch&tbnid=qiLst4BkozVxkM:&imgrefurl=http://www.thefullwiki.org/Structural\\_Biochemistry/DNA\\_recombinant\\_techniques/Southern\\_Blot&docid=H0SgQ0vVEELIkM&imgurl=http://imagesmediawikisites.thefullwiki.org/01/4/8/3/656652084498882.jpg&w=550&h=367&ei=9w0mT6qgI4nsALlp9CMAg&zoom=1&iact=hc&vpx=826&vpy=126&dur=386&hovh=183&hovw=275&tx=140&ty=90&sig=116332333039749505145&page=5&tbnh=142&tbnw=192&start=92&ndsp=28&ved=1t:429,r:11,s:92](http://www.google.com.mx/imgres?q=southern+blot&um=1&hl=es&sa=N&rlz=1R2WZPG_esMX448&biw=1366&bih=641&tbm=isch&tbnid=qiLst4BkozVxkM:&imgrefurl=http://www.thefullwiki.org/Structural_Biochemistry/DNA_recombinant_techniques/Southern_Blot&docid=H0SgQ0vVEELIkM&imgurl=http://imagesmediawikisites.thefullwiki.org/01/4/8/3/656652084498882.jpg&w=550&h=367&ei=9w0mT6qgI4nsALlp9CMAg&zoom=1&iact=hc&vpx=826&vpy=126&dur=386&hovh=183&hovw=275&tx=140&ty=90&sig=116332333039749505145&page=5&tbnh=142&tbnw=192&start=92&ndsp=28&ved=1t:429,r:11,s:92) citado el 21 de junio de 2012.
64. [http://www.google.com.mx/imgres?q=gel+electrophoresis&um=1&hl=es&rlz=1R2WZPG\\_esMX448&biw=1366&bih=641&tbm=isch&tbnid=fi\\_c9M4sbmEDIM:&imgrefurl=https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/students/andrewbhagyam/gelpreparation&docid=vLbL4u4NW9LDiM&imgurl=http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/labs/genetics/genetics\\_gels/gel\\_loading\\_P2220051.jpg&w=640&h=480&ei=u0YmT8PFGNDDsQLnhGMAg&zoom=1&iact=hc&vpx=565&vpy=333&dur=1284&hovh=194&hovw=259&tx=123&ty=160&sig=116332333039749505145&page=5&tbnh=135&tbnw=191&start=101&ndsp=26&ved=1t:429,r:2,s:101](http://www.google.com.mx/imgres?q=gel+electrophoresis&um=1&hl=es&rlz=1R2WZPG_esMX448&biw=1366&bih=641&tbm=isch&tbnid=fi_c9M4sbmEDIM:&imgrefurl=https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/students/andrewbhagyam/gelpreparation&docid=vLbL4u4NW9LDiM&imgurl=http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/labs/genetics/genetics_gels/gel_loading_P2220051.jpg&w=640&h=480&ei=u0YmT8PFGNDDsQLnhGMAg&zoom=1&iact=hc&vpx=565&vpy=333&dur=1284&hovh=194&hovw=259&tx=123&ty=160&sig=116332333039749505145&page=5&tbnh=135&tbnw=191&start=101&ndsp=26&ved=1t:429,r:2,s:101) citado el 21 de junio de 2012.
65. <http://www.usc.es/gi1608/equip.php> citado el 21 de junio de 2012.
66. <http://ecovi.tripod.com/id19.html> citado el 23 de junio de 2012.

67. [http://www.biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1109tecnica\\_electroforesis](http://www.biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1109tecnica_electroforesis) citado el 23 de junio de 2012.
68. <http://www.flickr.com/photos/iacsaragon/sets/72157629087877197/detail/> citado el 26 de junio de 2012.
69. <http://www.labotrade.com/apartados.asp?a=&w=2> citado el 26 de junio de 2012.
70. <http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html> citado el 26 de junio de 2012.
71. <http://www.doschivos.com/display.asp?ID=644&f=13547> citado el 26 de junio de 2012.
72. [http://www.ugr.es/~quiorred/lab/oper\\_bas/crom.htm](http://www.ugr.es/~quiorred/lab/oper_bas/crom.htm) citado el 26 de junio de 2012.
73. [http://www.google.com.mx/imgres?q=cromatografia+en+capa+fina&hl=es&sa=X&biw=1017&bih=477&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=AusWuAYDiRSaRM:&imgrefurl=http://www.danac.org.ve/semana/index.php%3Fid\\_semana%3D168&docid=iHNrMzogkztLWM&imgurl=http://www.danac.org.ve/semana/imagenes/TLC32.jpg&w=510&h=383&ei=MAoeUN1LeKe2AXS9YDwDg&zoom=1&iact=hc&vpx=719&vpy=2&dur=620&hovh=194&hovw=259&tx=155&ty=38&sig=116332333039749505145&page=2&tbnh=128&tbnw=192&start=12&ndsp=16&ved=1t:429,r:10,s:12,i:207](http://www.google.com.mx/imgres?q=cromatografia+en+capa+fina&hl=es&sa=X&biw=1017&bih=477&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=AusWuAYDiRSaRM:&imgrefurl=http://www.danac.org.ve/semana/index.php%3Fid_semana%3D168&docid=iHNrMzogkztLWM&imgurl=http://www.danac.org.ve/semana/imagenes/TLC32.jpg&w=510&h=383&ei=MAoeUN1LeKe2AXS9YDwDg&zoom=1&iact=hc&vpx=719&vpy=2&dur=620&hovh=194&hovw=259&tx=155&ty=38&sig=116332333039749505145&page=2&tbnh=128&tbnw=192&start=12&ndsp=16&ved=1t:429,r:10,s:12,i:207) citado el 26 de junio de 2012.
74. <http://bioreactorcrc.wordpress.com/2012/03/12/diseo-de-reactores-tubulares-para-la-absorcin-y-adsorcin-de-compuestos-bioactivos-dentro-de-lechos-empacados-enfoque-terico-prctico/> citado el 26 de junio de 2012.
75. <http://www.eez.csic.es/?q=es/node/1187> citado el 28 de junio de 2012.
76. <http://www.destileriascompostela.es/calidad.htm> citado el 28 de junio de 2012.
77. <http://www.portaldemisterios.com/videos/yt-rFzToepOmJA> citado el 30 de junio de 2012.

# ANEXO I

## DIAGRAMA DE PRUEBAS PARA MEDICAMENTOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGIA





**VALORACIÓN**

- Estándares de Referencia USP
- Diseño y Análisis de Valoraciones Biológicas
- Volumetría
- Cromatografía
- Electroforesis
- Electroforesis Capilar
- Espectrometría de Masas
- Resonancia Magnética Nuclear
- Rotación Óptica
- Espectrofotometría y Dispersión de luz
- Artículos obtenidos por Biotecnología

**FISICOQUÍMICAS**

- Estándares de Referencia USP
- Cromatografía
- Electroforesis
- Electroforesis capilar
- Espectrometría de Masas
- Resonancia Magnética Nuclear
- Osmolaridad y Osmolalidad
- Estimación de la Distribución del Tamaño de Partícula por Tamizado Analítico
- pH
- Índice de Refracción
- Espectrofotometría y Dispersión de Luz
- Cromatografía Iónica
- Artículos obtenidos por Biotecnología

