



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de agosto hasta el 30 de septiembre de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA 0311. ELECTROFORESIS El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada eléctricamente cuando ésta se somete a un campo eléctrico, moléculas biológicamente importantes como el DNA, RNA y proteínas, poseen cargas eléctricas y por ende pueden moverse cuando se someten a un campo eléctrico; históricamente el primer método electroforético se realizó en una solución de sacarosa en la que se movían libremente (electroforesis libre) los componentes por analizar cuando se aplicaba un campo eléctrico. La electroforesis libre presentaba varios problemas principalmente el ser de baja resolución, pero poco tiempo después aparecieron nuevos métodos electroforéticos los cuales hacen uso de diversos tipos de soporte como son: papel, acetato de celulosa, almidón, agarosa, poliacrilamida, etc. El		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
fin de usar un medio de soporte para realizar la electroforesis, es el de eliminar la difusión de las muestras, en tal forma que los componentes ya separados permanecen en una zona "estrecha" (electroforesis zonal) lo que conduce a una máxima resolución entre ellos.		
El medio de soporte usado para la electroforesis influye en la movilidad y en la capacidad de resolución, esto puede deberse a la adsorción de las moléculas al soporte, a la falta de homogeneidad del material utilizado como soporte y a la electroendósmosis. Los dos primeros factores no requieren de mayor explicación y en el caso de la electroendósmosis, esto es debido a la existencia de grupos químicos cargados eléctricamente en las moléculas que constituyen el soporte, por ejemplo, el papel tiene un número reducido de grupos carboxilo y en el caso de la agarosa, ésta tiene grupos sulfónicos; en reguladores neutros o básicos, estos grupos se ionizan y son atraídos hacia el ánodo (+) durante la electroforesis. Sin embargo, la atracción de estos grupos no es posible puesto que se trata de un soporte sólido, de tal manera que este efecto es compensado por una migración de iones H^+ hacia el cátodo (-), que resulta en un movimiento efectivo del disolvente, debido a esto, moléculas sin carga eléctrica a ese pH son arrastradas por el disolvente hacia el cátodo.		
En virtud de todo lo anterior, el medio de soporte de elección para la electroforesis deberá ser		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
químicamente inerte durante el proceso de separación uniforme en sus propiedades y ser de preparación fácil y reproducible. Los medios de soporte más comúnmente usados son papel, acetato de celulosa, gel de almidón, agarosa o gel de poliacrilamida. Al final del corrimiento el soporte puede ser teñido o usado para autorradiografía, y/o conservación.		
El uso de los diferentes soportes para electroforesis ha dado lugar a una gran variedad de aplicaciones de la misma. A continuación, se presentarán sólo las de uso común.		
EQUIPO 1. Fuente de poder adecuada que administre una corriente constante directa y aditamentos para indicar y controlar tanto el voltaje que se suministra como el consumo de corriente. Se puede adicionar un circuito que estabilice la salida de corriente (regulador de voltaje). 2. Ensamble electroforético con aditamentos apropiados para soportar las placas electroforéticas. Para la electroforesis en donde se utilice papel o acetato de celulosa como soporte electroforético, el ensamble consiste de un tanque con tapa de vidrio o de otro material que permita el cerrado hermético. El tanque contiene aditamentos de seguridad los cuales desconectan la fuente de energía cuando se quita la tapa. Tiene, además, dos dobles canales en cada extremo provistos de una parte divisoria central. A lo largo del fondo de uno de los compartimientos		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
de cada doble canal se encuentra un electrodo de platino conectado por medio, de cables aislados y sellados a las paredes del tanque, al cable externo conectado a la fuente de poder. Los canales se llenan con suficiente cantidad de la solución de electrolitos especificada en la monografía, para asegurar la inmersión completa de los electrodos. El contacto entre el compartimiento interno y el externo de cada doble canal puede ser por medio de un puente de papel electroforético o bien mediante pequeñas perforaciones de la parte central divisoria. Para electroforesis en gel de poliacrilamida el ensamble consiste en dos envases de polimetilmetacrilato para la solución amortiguadora, conteniendo cada uno un electrodo de platino. El envase superior está montado verticalmente arriba del inferior y su altura es ajustable. En su base, tiene una serie de soportes de hule situados equidistantes del electrodo. Los electrodos están conectados, por medio de cables aislados, a la fuente de poder de tal forma que el cátodo se encuentra en el envase superior y el ánodo en el inferior. 3. Soporte electroforético. Para electroforesis en papel y en acetato de celulosa, el soporte electroforético es en forma de tiras sostenidas entre los canales sobre una superficie uniforme compuesta de puntos de contacto de plástico inerte o vidrio, espaciadas para minimizar la difusión capilar de la solución de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
electrólitos. El soporte electroforético se conecta directamente (electroforesis en papel y en acetato de celulosa), al compartimiento de cada doble canal que no contiene el electrodo. Para electroforesis en gel de poliacrilamida el soporte se genera por la polimerización de la acrilamida y la bis acrilamida, formando un gel que puede ser teñido o transferido a papel de nitrocelulosa lo que amplía la gama de aplicación.		
MÉTODOS		
ELECTROFORESIS EN PAPEL. Llenar los canales del tanque con la solución de electrolitos especificados en la monografía correspondiente. Aplicar los volúmenes de las soluciones, preparadas como se indica en la monografía correspondiente, a lo largo de la línea base del papel a 1 cm del borde y a no menos de 2.5 cm de distancia entre una y otra aplicación. Dejar que las manchas se sequen y colocar el papel en el compartimiento apropiado, de tal forma que el extremo en donde se encuentra la línea base de aplicación quede en la pila donde se encuentra el ánodo y el otro extremo en la pila del cátodo. Humedecer el papel con la solución de electrolitos, teniendo cuidado de no humedecer la parte en donde se hizo la aplicación de las muestras. Cerrar el tanque, dejar que la solución de electrolitos se difunda a partir de la línea base, si es necesario cubrir el aparato para protegerlo de la		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
luz, conectar los cables a la fuente de poder y accionar el equipo. Ajustar el voltaje a aproximadamente 20 volts por centímetro de papel y dejar que se realice la electroforesis durante el tiempo indicado o hasta que las sustancias se muevan la distancia especificada en la monografía correspondiente. Desconectar el equipo, sacar el papel de la cámara, secar bajo corriente de aire protegido de la luz y examinar el papel con una lámpara de luz UV.		
ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA. Llenar los canales del aparato con la solución de electrólitos especificada en la monografía. Sumergir la placa de acetato de celulosa de dimensiones adecuadas, durante 5 min en la misma solución y presionar las tiras secas entre el papel filtro. Aplicar en la placa 10 µL de cada una de las soluciones descritas en la monografía a 1 cm de la terminal del ánodo y a 2.5 cm de distancia entre una y otra. Ajustar el voltaje al especificado en la monografía y dejar que se realice la electroforesis durante el tiempo indicado. Presionar las tiras secas, sumergirlas en una solución preparada disolviendo 1 g de hexacianoferrato de potasio en 50 mL de agua y añadir 2 mL de solución saturada de cloruro férrico. Lavar con una solución de ácido ortofosfórico al 5 % (v/v) hasta que el fondo sea de color claro y finalmente lavar con agua. Examinar el electroforetograma.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA. Existen dos métodos electroforéticos usando geles de poliacrilamida y varían en que uno se realiza en geles cilíndricos (electroforesis en disco) y el otro se realiza en geles en placa, ambos son técnicamente sencillos de efectuar y su capacidad de resolución es similar, pero una mayor cantidad de muestra puede ser aplicada en los geles en placa, en comparación de los geles cilíndricos. Una ventaja que tiene la electroforesis en placa es el número de muestras que pueden ser analizadas en una sola placa de gel y en esa forma todas están sujetas a idénticas condiciones y pueden ser comparadas por separado, de tal manera que una comparación exacta puede ser difícil, puesto que mantener las mismas condiciones en todos los geles a lo largo de la prueba no siempre es fácil. La técnica se describe en el MPB 0270.		
A) Solución de acrilamida-bisacrilamida: - Acrilamida - Bis-acrilamida - Llevar al aforo a 100 mL con agua destilada. - B) Solución amortiguadora Tris HCl 1.5 M pH 8.8 - Tris (hidroximetil) amino - metano - Disolver en $\pm$ 50 mL, 60 mL de agua destilada y añadir ácido clorhídrico 1 N hasta	- 30 g 0.8 g - - - - 18.171 g -	



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice		Debe decir	Justificación*
-	ajustar el pH a 8.8 (aproximadamente 30 mL de ácido clorhídrico).	-	
-	-	-	
G)	Solución amortiguadora Tris HCl 0.5 M pH 6.8:	-	
-	Tris (hidroximetil) amino metano	6.057 g	
-	Disolver en $\pm$ 30 mL 40 mL de agua destilada y añadir ácido clorhídrico 1 N hasta ajustar el pH a 6.8 (aproximadamente 48 mL de ácido clorhídrico).	-	
-	-	-	
D)	Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %	-	
-	Dodecil sulfato de sodio	10 g	
-	Llevar al aforo a 100 mL con agua destilada.	-	
E)	Solución de persulfato de amonio al 10 %	-	
-	Persulfato de amonio	0.1 g	
-	Agua destilada	1.0 mL	
-	Preparar inmediatamente antes de usar.	-	
F)	Solución amortiguadora para la muestra (2X usar tal cual)	-	
-	Solución amortiguadora Tris HCl 0.5 M, pH 6.8	10 mL	
-	Solución de SDS al 10 %	10 mL	
-	2-mercapto etanol	1 mL	
-	Glicerol	10 mL	
-	Agua destilada	19 mL	
-	-	-	



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice		Debe decir	Justificación*
G)	Solución amortiguadora Tris-Glicina SDS pH 8.3	-	
-	Tris (hidroximetil) amino metano	3 g	
-	Glicina	14.4 g	
-	Dodecil sulfato de sodio	1 g	
-	Ajustar el pH a 8.3 y llevar al aforo a 1 000 mL con agua destilada.	-	
-	-	-	
H)	Solución de azul de bromofenol al 0.5 % en glicerol al 20 %	-	
-	Azul de bromofenol	0.05 g	
-	Glicerol al 20 % en agua destilada	10 mL	
-	-	-	
Antes de preparar los geles debe asegurarse que todo el material a utilizar (vidriería y equipo de electroforesis) haya sido lavado cuidadosamente y enjuagado con agua destilada. Las muestras por analizar deben tener una concentración de proteínas conocida a fin de elegir el volumen a emplear durante la electroforesis, en general se emplean volúmenes pequeños (200 a 400 µL) volúmenes mayores no son recomendables			
-			
Tabla 0311.1. Proporciones de reactivos expresadas en mililitros.			
-	5 % 7.5 % 10 % 12.5 % 15 % 17.5 % 20 %		
Solución de monómeros	4.97 7.4 9.9 12.27 14.75 17.2 19.7		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice					Debe decir			Justificación*
Agua destilada	17.53	14.75	12.25	9.73	7.3	4.85	2.35	
Solución amortiguadora Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	
Solución de SDS al 10 %	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
TEMED	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
Solución de persulfato al 10 %	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
-								
La concentración total de proteínas de las muestras que se colocan en los geles deben ser: para las muestras puras (una proteína) alrededor de 10 a 15 µg y para mezclas complejas utilizar 150 a 250 µg. Las características de composición que reúne un gel para el análisis de una proteína en particular o una mezcla de ellas no pueden ser establecidas más que por el método de ensayo y error, de tal manera que es necesario probar geles a diferentes concentraciones hasta encontrar aquella que proporcione los mejores resultados. En general, una concentración media de acrilamida con la que la mayoría de proteínas puras y mezclas de las mismas dan resultados de resolución aceptables es del 12.5 %. En la tabla 0311.1 se dan las proporciones de reactivos expresadas en mililitros, que deben emplearse para obtener geles de las concentraciones más empleadas. Si se desea preparar geles con concentraciones diferentes a las indicadas, basta hacer los cálculos								



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
para ajustar los volúmenes de la solución de monómeros (acrilamida + bis-acrilamida) y de agua destilada para obtener la concentración elegida, el resto de los reactivos no se altera en su proporción. El equipo de electroforesis debe de armarse de acuerdo con las instrucciones de cada equipo en particular, después de ensamblado el equipo debe de colocarse sobre una superficie horizontal, antes de vaciar los reactivos que forman el gel, es conveniente probar las cámaras donde se construirá el gel, esto puede efectuarse con agua destilada para constatar que no existen fugas, una vez probada la hermeticidad de la cámara, se elimina el agua destilada y el exceso se elimina con papel absorbente. Antes de mezclar las soluciones para preparar el gel, debe permitirse que éstas alcancen la temperatura ambiente y una vez ocurrido, la mezcla se prepara en un matraz Kitasato, colocando primero: la solución de monómeros, agua destilada y la solución amortiguadora de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 en los volúmenes indicados en la tabla 0311.1 y de acuerdo a la concentración del gel elegido. El matraz se tapa perfectamente y con la ayuda de una bomba de presión vacío se le hace vacío para eliminar los gases disueltos que pueden producir burbujas durante la gelificación. Aproximadamente de 15 a 20 min con agitación suave y ocasional son suficientes para eliminar gases, después de ese tiempo se agrega el resto		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
de los reactivos indicados en la tabla y se mezclan suavemente, inmediatamente después se coloca dentro de la cámara para formar el gel. El volumen que se prepara de la mezcla anterior dependerá del número de geles a preparar y del volumen que requiera cada cámara, y esto varía para cada equipo de electroforesis. La mezcla anterior es la que formará el gel de corrimiento y habitualmente este gel ocupa 4/5 partes del total del gel. Inmediatamente después de haber vaciado en la cámara del gel la mezcla de reactivos y antes de que gelifiquen, se coloca sobre la mezcla una "capa" de agua destilada de aproximadamente 1.0 cm de altura, la adición del agua puede hacerse con la ayuda de una pipeta Pasteur y con mucho cuidado para evitar que se mezclen las soluciones. Si la adición del agua se realiza correctamente, se observará nítidamente una interfase entre la solución que formará el gel y el agua, el propósito de la capa de agua es que la superficie del gel quede plana. Si no se toma la precaución de colocar dicha capa de agua, la solución polimerizará dejando una superficie cóncava debido al menisco y si esto ocurre, las bandas de las proteínas por analizar al separarse tomarán esa forma. Poco tiempo después de que se coloca la capa de agua, la interfase formada entre las dos soluciones desaparecerá y se debe a una ligera difusión de las soluciones en esa área pero cuando la polimerización del gel ha ocurrido completamente,		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*												
nuevamente aparecerá la línea de interfase y ésta será la señal para continuar con la elaboración del gel. La capa de agua destilada que se utilizó para lograr una superficie plana del gel de corrimiento se elimina invirtiendo la cámara del gel, y con la ayuda de un papel absorbente se quita cualquier remanente. Para la preparación del gel espaciador se utiliza la siguiente mezcla de reactivos en las proporciones que se indican:-														
<table><tr><td>Solución de monómeros</td><td>5 mL</td></tr><tr><td>Agua destilada</td><td>17.5 mL</td></tr><tr><td>Solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8</td><td>7.5 mL %</td></tr><tr><td>Solución de SDS al 10 %</td><td>0.3 %</td></tr><tr><td>TEMED</td><td>0.3 % mL</td></tr><tr><td>Solución de persulfato al 10 %</td><td>0.15 % mL</td></tr></table> Al igual que en la preparación del gel de corrimiento, primero se mezclan, dentro de un matraz Kitasato, la solución de monómeros, el agua destilada y la solución amortiguadora, el matraz se tapa y se le hace vacío, con un poco de esta mezcla y antes de añadirle el resto de los reactivos, se enjuaga la cámara del gel, posteriormente, al resto de la mezcla se le adiciona los reactivos restantes, se mezclan y se vacían en la cámara donde ya se encuentra formado el gel de corrimiento.	Solución de monómeros	5 mL	Agua destilada	17.5 mL	Solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	7.5 mL %	Solución de SDS al 10 %	0.3 %	TEMED	0.3 % mL	Solución de persulfato al 10 %	0.15 % mL		
Solución de monómeros	5 mL													
Agua destilada	17.5 mL													
Solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	7.5 mL %													
Solución de SDS al 10 %	0.3 %													
TEMED	0.3 % mL													
Solución de persulfato al 10 %	0.15 % mL													



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Si se está formando el gel en placa, colocar el "peine" del equipo en su posición antes de que ocurra la gelificación, en caso de estarse utilizando tubos para los geles, cuidadosamente y sin mezclar coloque una capa de agua destilada sobre la mezcla de gel espaciador a fin de evitar que la superficie de este gel polimerice en forma convexa. Una vez que se ha formado el gel espaciador es conveniente adicionarle un poco de la solución amortiguadora de corrimiento (Tris-Glicina-SDS pH 8.3) para evitar la desecación de los geles hasta su uso. Es común utilizar los geles varias horas (12 a 18 h) después de su preparación y esto es para asegurarse que la polimerización ha sido completa. Antes de poner las muestras en los geles se les añade, 3 µL de la solución de azul de bromofenol, el cual funciona como marcador, ya que esta molécula, tiene una movilidad electroforética mayor que la mayoría de las proteínas. Inmediatamente después de colocar todas la muestras y antes de que empiecen a difundir, se le hace pasar una corriente eléctrica, en el caso de geles en placa, 10 mA es la corriente adecuada durante el corrimiento en el gel espaciador, una vez que el azul de bromofenol ha penetrado en el gel de corrimiento, la corriente eléctrica se incrementa a 25 mA y así se mantiene hasta que el colorante alcanza una distancia de 1 a 1.5 cm del borde del gel. Para el caso de los geles en tubo, una corriente eléctrica de 2 mA por tubo para el corrimiento		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
dentro del gel espaciador es la adecuada y de 3 mA por tubo para el corrimiento subsiguiente, al igual que para los geles en placa, se detiene el paso de corriente eléctrica cuando el colorante esté de 1 cm a 1.5 cm del borde del gel. Una vez terminado el corrimiento electroforético los geles se sacan de la cámara para proceder a su fijación y tinción. Existen un gran número de colorantes y técnicas empleadas para visualizar las moléculas que han sido separadas en los geles, antes de realizar la tinción, las moléculas deben de fijarse al gel para evitar su difusión; la fijación puede hacerse como un paso independiente o incluir al fijador en la solución del colorante así que la fijación y la tinción se llevan al cabo simultáneamente. La tinción más frecuentemente empleada para teñir proteínas en geles de poliacrilamida es con azul de coomassie (azul brillante), esta tinción ha sustituido a la de amido negro debido a su mayor sensibilidad, especialmente en la presencia de SDS. Los geles son fijados y teñidos sumergiéndolos durante 3 h en la siguiente solución previamente filtrada en papel filtro número 1.		
Azul de Coomassie- 1.25 g Metanol absoluto 227 mL Agua destilada 227 mL Ácido acético glacial 45 mL Después del tiempo requerido para la fijación y tinción, los geles se sumergen en una mezcla de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
metanol, agua destilada y ácido acético glacial en la misma proporción que la solución anterior. Con cambios frecuentes de esta solución se elimina el exceso de colorantes y el tiempo requerido para ello es variable, pero deberá tenerse cuidado de no excederse en los lavados, pues se corre el riesgo de que las bandas teñidas tenuemente puedan desaparecer.		
ISOELECTROENFOQUE (IEF). Es un método de electroforesis que separa las proteínas según su punto isoelectrico. La separación se realiza en un gel en placa de poliacrilamida o de agarosa que contiene una mezcla de electrolitos anfóteros (anfolitos). Cuando se someten a un campo eléctrico, los anfolitos migran en el gel creando un gradiente de pH. En algunos casos se utilizan geles que contienen un gradiente de pH inmovilizado, preparados incorporando ácidos y bases débiles en regiones específicas de la red del gel durante la preparación del mismo. Cuando las proteínas alcanzan la fracción del gel que tiene un pH que es igual a su punto isoelectrico (pI), su carga se neutraliza y cesa su migración. Según la mezcla de anfolitos elegida, es posible crear los gradientes en diversos intervalos de pH.		
Aspectos teóricos Cuando una proteína está en la posición de su punto isoelectrico, su carga neta es nula y no se puede mover en la matriz de gel por efecto del campo eléctrico. Sin embargo, puede moverse de dicha posición por difusión. El gradiente de pH y el		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
campo eléctrico forzan forzan a una proteína a permanecer en la posición de su punto isoelectrónico, donde se concentra; este efecto de concentración se denomina "enfoco". El aumento del voltaje aplicado o la reducción de la cantidad de muestra tienen por efecto mejorar la resolución de las bandas. Sin embargo, el voltaje aplicado está limitado por el calor generado, que debe ser disipado. La utilización de geles delgados y un sistema eficaz de refrigeración de la placa, controlado por un recirculador termostático, evita que se queme el gel a la vez que permite un enfoque fino. La resolución Para aumentar la resolución de las bandas, o se reduce la cantidad de muestra, o se aumenta el voltaje aplicado. Sin embargo, esto último se ve limitado por el calor que genera, que debe disiparse. Para evitar que se queme el gel, se utilizan geles delgados y se emplea un sistema eficaz de refrigeración de la placa, controlado por un recirculador termostático. La resolución se estima determinando la diferencia mínima de pI (ΔpI), que es necesaria para separar 2 bandas vecinas:		
$\Delta pI = 3x \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$		
Donde: D = Coeficiente de disusión difusión de la proteína. dpH/dx = Gradiente de pH. E = Intensidad del campo eléctrico, en voltios por centímetro.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
$-d\mu/dpH$ = Variación de la movilidad del soluto con el pH en la región próxima al pl. Puesto que D y $(-d\mu)/dpH$ son propiedades intrínsecas de las proteínas y no pueden ser alteradas, se puede mejorar la resolución utilizando un intervalo más estrecho de pH y aumentando la intensidad del campo eléctrico. Puesto que D y $(-d\mu)/dpH$ son propiedades intrínsecas de las proteínas y no pueden alterarse, la resolución se puede mejorar utilizando un intervalo de pH más estrecho y aumentando la intensidad del campo eléctrico. Para aumentar la resolución entre bandas de proteínas que presentan una diferencia de pl de sólo 0.02 unidades de pH en un gel de IEF, se pueden utilizar anfolitos vectoriales (aminoácidos modificados, péptidos cortos, poliaminas y poliácidos sintéticos). Estas moléculas están diseñadas para tener un pl exacto y pueden cubrir un intervalo de valores de pl muy bajos (entre 0.01 y 0.05 unidades). La función de los anfolitos vectoriales es generar y mantener en el gel, durante toda la corrida de electroforesis, microzonas extremadamente estrechas de pH (micro-amortiguamiento) que da lugar a un gradiente de pH muy fino y estable, prácticamente continuo; lo que obliga a la proteína a neutralizarse y enfocarse solamente a su valor de pl. Cualquier desviación de 0.01 de pH vuelve a cargarla y la obliga a migrar, aumentando la resolución.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
La resolución entre las bandas de proteínas sobre un gel de IEF preparado con anfolitos vectores puede ser bastante buena. Se puede mejorar la resolución utilizando gradientes de pH inmovilizados en los que las especies amortiguadoras que son análogas a los anfolitos vectores, están copolimerizadas dentro de la matriz del gel. Las proteínas que presentan una diferencia de pI de sólo 0.02 unidades de pH se pueden resolver utilizando un gel preparado con anfolitos vectores, mientras que los gradientes de pH inmovilizados pueden resolver las proteínas que presentan una diferencia de pI de aproximadamente 0.001 unidades de pH.		
Recomendaciones Se debe prestar una especial atención a las características y/o preparación de la muestra. La presencia de sal en la muestra puede ser problemática y es mejor preparar la muestra, si es posible, en <i>agua purificada nivel 2</i> o en una disolución de anfolitos al 2 %, utilizando, si es necesario, diálisis o filtración en gel. El tiempo requerido para completar el enfoque en geles de poliacrilamida se determina depositando una proteína coloreada (por ejemplo, hemoglobina) en diferentes posiciones sobre la superficie del gel y aplicando el campo eléctrico: el estado de equilibrio se alcanza cuando todas las aplicaciones dan un perfil de bandas idéntico. En algunos protocolos, el punto final del enfoque se indica por el tiempo transcurrido desde la aplicación de la		

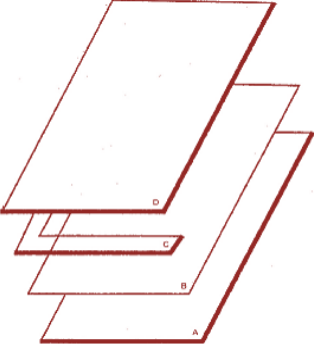


“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
muestra. El gel de IEF se puede utilizar como un ensayo de identidad cuando el perfil de migración sobre el gel se compara con el de una preparación patrón adecuada y con las proteínas de calibración del IEF. Dicho gel puede también utilizar como una prueba límite cuando la densidad de una banda en IEF se compara subjetivamente con la densidad de las bandas que aparecen en una preparación patrón, o se puede utilizar como una prueba cuantitativa, a condición de ser validado, cuando se mide la densidad utilizando un densitómetro o instrumento similar para determinar la concentración relativa de cada banda.		
APARATO		
Un aparato para Isoelectroenfoque consiste en:		
- Un generador regulable capaz de proporcionar una corriente constante en tensión, intensidad y potencia. Se utilizan en general potenciales de 2500 V, los cuales se consideran óptimos en ciertas condiciones operativas. Se recomienda un suministro de hasta 30 W de potencia constante.		
- El aparato incluye además una cámara plástica rígida de Isoelectroenfoque que contiene una placa enfriada de un material adecuado para sostener el gel.		
- Y una cubierta plástica con electrodos de platino que se conectan al gel por medio de papel absorbente de largo, ancho y		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
grosor adecuados, impregnado con soluciones de electrólitos anódicos y catódicos.		
ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA.		
El siguiente método es una descripción detallada de un procedimiento de IEF en placas gruesas de gel de poliacrilamida, que se utiliza a menos que la monografía indique algo diferente.		
PREPARACIÓN DE LOS GELES		
Molde		
El molde está compuesto por una placa de vidrio (A) sobre la cual se coloca la película de poliéster (B) para facilitar la manipulación del gel, uno o más espaciadores (C), una segunda placa de vidrio (D) y pinzas para mantener unida la estructura (ver Figura 0311.1).		
		
Figura 0311.1 Molde		
Gel de poliacrilamida al 7.5%		
Disolver 29.1 g de acrilamida y 0.9 g de metilenbisacrilamida en 100 mL de agua. Agregar		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
la mezcla de anfolitos especificada en la monografía individual a 2.5 volúmenes de esta solución y diluir hasta 10 volúmenes con agua. Mezclar cuidadosamente y desgasificar la solución.		
Preparación del molde		
Colocar la película de poliéster sobre la placa de vidrio inferior, aplicar el espaciador, colocar la segunda placa de vidrio y las pinzas. Antes de usar, colocar la mezcla en un agitador magnético y agregar 0.25 volúmenes de una solución de persulfato de amonio de 100 g/L y 0.25 volúmenes de tetrametilendiamina. Llenar inmediatamente el espacio entre las placas de vidrio del molde con la solución.		
Procedimiento general PROCEDIMIENTO GENERAL		
Desmontar el molde y, utilizando la película de poliéster, transferir el gel al soporte enfriado, humedecido con unos mililitros del líquido indicado en la monografía, teniendo especial cuidado de evitar la formación de burbujas de aire. Preparar la muestra y las soluciones de referencia como se especifique en la monografía. Colocar sobre el gel tiras de papel para aplicación de las muestras, de aproximadamente 10 mm x 5 mm e impregnar cada una con la cantidad prescrita de la muestra y de la solución de referencia. Aplicar también la cantidad indicada de una solución de proteínas de puntos isoelectricos conocidos como marcadores de pH para calibrar el gel. En algunos protocolos el gel tiene ranuras premoldeadas en las que se		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
aplica la preparación de la muestra en lugar de utilizar tiras de papel impregnadas. Cortar 2 tiras de papel con la longitud del gel e impregnarlas con las soluciones de los electrolitos: solución ácida para el ánodo y alcalina para el cátodo. La composición de las soluciones anódica y catódica se indica en la monografía. Aplicar estas mechas de papel a cada lado del gel a varios milímetros del borde. Colocar la tapa de modo que los electrodos estén en contacto con las mechas (respetando los polos anódico y catódico). Proceder al isoelectroenfoque aplicando los parámetros eléctricos descritos en la monografía. Desconectar la corriente cuando se haya estabilizado la migración de la mezcla de las proteínas patrón. Utilizando pinzas, retirar las tiras de aplicación de la muestra y las 2 mechas unidas a los electrodos. Sumergir el gel en solución de fijación para isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. Incubar con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 min. Vaciar la solución y añadir 200 mL de solución decolorante/desteñido. Incubar con agitación durante 1 h. Drenar el gel, añadir solución de colorante Coomassie. Incubar durante 30 min. Decolorar el gel por difusión pasiva con disolución de decoloración hasta que las bandas se observen claramente frente a un fondo claro. Localizar la posición e intensidad de las bandas en el electroferograma como se describe en la monografía.		
Variaciones al procedimiento general		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Cuando se hace referencia al método general de isoelectroenfoque, se pueden hacer variaciones en la metodología o en el procedimiento, pero deben ser validadas. Estas incluyen:		
el uso de geles premoldeados comercialmente disponibles y de kits comerciales de coloración y decoloración,		
el uso de tiras gradientes de pH inmovilizados,		
el uso de geles cilíndricos,		
el uso de geles de diferentes dimensiones, incluyendo los geles ultrafinos (0.2 mm), variaciones en el procedimiento de aplicación de la muestra, incluyendo diferentes volúmenes de la muestra o el empleo de máscaras o mechas de aplicación de la muestra de un material distinto al papel,		
el uso de condiciones de migración alternativas, incluyendo variaciones en el campo eléctrico dependiendo de las dimensiones del gel y del equipo, y el uso de tiempos de migración fijos en lugar de la interpretación subjetiva de la estabilidad de las bandas,		
la inclusión de una etapa de pre-enfoque,		
el uso de instrumentación automática,		
el uso de geles de agarosa,		
la adición de urea al gel de migración (una concentración 3 M es con frecuencia suficiente para mantener la proteína en		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
disolución, pero se pueden utilizar concentraciones de hasta 8 M). Algunas proteínas precipitan en su punto isoeléctrico; en este caso, se incluye urea en la formulación del gel para mantener la proteína en disolución; si se utiliza urea, solamente se deben utilizar disoluciones recién preparadas para evitar la carbamilación de la proteína;		
el uso de métodos de coloración alternativos;		
la incorporación al gel de aditivos, tales como detergentes no iónicos (por ejemplo, octilglucósido) o detergentes zwitteriónicos y la adición de anfólitos a la muestra, para evitar la agregación o precipitación de las proteínas.		
Validación de los procedimientos de isoelectroenfoque		
Los siguientes criterios se pueden utilizar para validar la separación:		
formación de un gradiente de pH estable de características deseadas, evaluadas por ejemplo utilizando marcadores de pH coloreados de puntos isoeléctricos conocidos,		
comparación con el isoelectroferograma suministrado con la sustancia química de referencia para la preparación a examinar,		
cualquier otro criterio de validación descrito en la monografía.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Puntos a considerar		
Las muestras se pueden aplicar en cualquier zona del gel, pero para proteger las proteínas de los ambientes de pH extremo, las muestras no deben ser aplicadas cerca de cualquiera de los electrodos. Durante el desarrollo del método, el analista puede intentar aplicar la proteína en 3 posiciones del gel (es decir, en el centro y en ambos extremos); el comportamiento de una proteína depositada en extremos opuestos del gel puede no ser idéntico.		
Un fenómeno conocido como deriva catódica, en el cual el gradiente de pH decae con el tiempo, puede surgir si el enfoque del gel dura demasiado tiempo. Aunque este fenómeno no es aún bien comprendido, la electroendósmosis y la absorción de dióxido de carbono pueden ser los factores que llevan a la deriva catódica. La deriva catódica se observa cuando la proteína focalizada migra hacia el extremo catódico del gel. Para resolver este problema se pueden utilizar gradientes de pH inmovilizados.		
Es importante un enfriamiento eficaz (aproximadamente 4 °C) del lecho sobre el que reposa el gel durante el enfoque. Los campos eléctricos elevados utilizados durante el isoelectroenfoque pueden llevar a un sobrecalentamiento y afectar la calidad del gel enfocado.		
REACTIVOS Y SOLUCIONES		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Solución fijadora para isoelectroenfoco en gel de poliacrilamida: Disolver 35 g de ácido 5 sulfosalicílico dihidrato y 100 g de ácido tricloroacético en agua para obtener 1000 ml.		
Tinción de Coomassie TS: Disolver 125 mg de azul brillante de Coomassie R-250 en 100 ml de una mezcla de agua, metanol y ácido acético (100) (5:4:1) y filtrar.		
Solución decolorante: Una mezcla de agua, metanol y ácido acético (100) (5:4:1).		
INMUNOELECTROFORESIS. Esta técnica combina la separación electroforética de los componentes antigénicos de una mezcla (generalmente de naturaleza proteica) en un soporte de gel de agarosa, y la visualización de alguno de estos antígenos mediante una reacción de inmunodifusión en gel con un antisuero (anticuerpo) específico. En este tipo de gel los antígenos y anticuerpos difunden libremente formando arcos de precipitación en donde se alcanza una zona de equivalencia; cada banda o arco formado representa una reacción antígeno-anticuerpo específica. Utilizar una solución amortiguadora, de las mencionadas en la <i>tabla 0311.2</i> . En caso necesario, el pH de la solución amortiguadora se ajusta con soluciones diluidas de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (por ejemplo 1 M o 0.1 M). Las soluciones tanto de antígeno como de anticuerpo, deben ser ajustadas a 10 g/L en		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

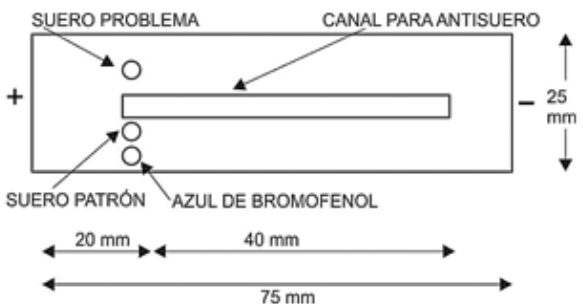
Dice	Debe decir	Justificación*
solución salina al 0.85-0.9 %. La solución de azul de bromofenol se prepara al 0.4 % en solución salina al 0.85-0.9 %. Preparar una solución de agarosa al 1 % en solución amortiguadora, disolviendo por calentamiento. Se puede adicionar solución de timerosal hasta una concentración final de 0.01 % como conservador. Dejar enfriar hasta aproximadamente 40 °C y aplicar aproximadamente 5 mL de solución de agarosa a laminillas de vidrio de 75 × 25 mm (portaobjetos de microscopio), permitir la gelificación a temperatura ambiente y guardar las laminillas en cámara húmeda hasta su utilización. Al inicio de la técnica de separación, se debe perforar la cubierta de agarosa haciendo pocillos de aproximadamente 2 mm de diámetro, como se indica en la figura 0311.42, llenando cada pocillo con muestra problema, suero patrón y azul de bromofenol.		
<i>Tabla 0311.21. Soluciones.</i> 1 Solución amortiguadora pH=8.6: a. Glicina-NaOH 0.1M b. Tris base-ácido bórico-EDTA 0.5M 2 Solución de timerosal al 0.01 % en solución amortiguadora. 3 Solución de agarosa al 1 % en solución amortiguadora		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
4 Mezcla de antígenos (muestra problema o suero patrón) [10 g/L]. 5 Solución de antisuero [10 g/L]. 6 Solución de azul de bromofenol al 0.4 %.		
Colocar las laminillas cargadas en la cámara de electroforesis con las muestras del lado del cátodo, y adicionar la cantidad adecuada de solución amortiguadora a ambos lados de los electrodos que permita establecer el circuito electroforético. Cerrar la cámara de electroforesis para evitar evaporación durante la corrida y aplicar un voltaje de corriente directa que permita establecer una corriente eléctrica entre 30 y 40 mA. El voltaje será suspendido cuando la solución de azul de bromofenol marque un frente de corrida de aproximadamente 4 cm. Extraer la laminilla de la cámara de electroforesis y hacer un canal longitudinal en uno de sus costados, llenándolo con aproximadamente 100 µL de solución de antisuero, y permitir la inmunodifusión y precipitación incubando en cámara húmeda a 20 °C durante 24 h. Para la interpretación de los resultados, el componente principal de la muestra problema debe corresponder al componente principal del suero patrón. La muestra problema puede presentar pequeñas cantidades de otras proteínas.		

“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
		
Figura 0311.42. Dimensiones de una laminilla para inmunolectroforesis, sitios para la muestra y posición dentro de la cámara de electroforesis.		
PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES AMORTIGUADORAS A UTILIZAR		
a. Buffer de Glicina-NaOH 0.1 M Solución A (glicina 1 M): disolver 75.07 g de glicina en 1 L de agua. Solución B (NaOH 1 N): disolver 40 g de NaOH en agua destilada llevando a aforo final de 1 L. Solución de trabajo Mezclar 100 mL de la solución A con 8 mL de la solución B, adicione aproximadamente 800ml de agua destilada, fije el pH a 8.6 y afore a 1 L.		
b. Buffer Tris base-ácido bórico-EDTA (TBE) Solución base de EDTA La solución de EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) debe prepararse con anticipación. Para una solución madre de 500 mL de EDTA 0.5 M, pesa 93.05 g de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
sal disódica de EDTA (FW = 372.2). Luego disuélvalo en 400 mL de agua desionizada y ajuste el pH con NaOH a 8.0. Después de eso, finalice el aforo de la solución hasta un volumen final de 500 mL. Solución madre de TBE. Prepare una solución madre concentrada de TBE pesando 54 g de Tris base (FW = 121.14) y 27.5 g de ácido bórico (FW = 61.83) y disolviendo ambos en aproximadamente 900 mL de agua desionizada. Luego agregue 20 mL de EDTA 0.5 M, ajuste la solución pH=8.6 y lleve a un volumen final de 1 litro. <i>Almacene a temperatura ambiente en botellas de vidrio transparente y deséchelo si se ha formado precipitado.</i> Solución de trabajo de TBE Para la electroforesis en gel de agarosa, se usa la solución amortiguadora TBE en una dilución 1:10 de la solución madre en agua desionizada. Las concentraciones finales de soluto son 45 mM tris-borato y 1 mM EDTA.		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.