



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS ESPECIFICADOS EN LA
FARMACOPEA EUROPEA PARA EL CONTROL DE
CALIDAD DE HEMODERIVADOS**

M^a Virginia Giménez Amezcuá

Tutor: Sofía Ródenas de la Rocha

Convocatoria Junio 2018

ÍNDICE.

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	4
METODOLOGÍA.....	4
FUNDAMENTO DE LA ELECTROFORESIS.....	4
TIPOS DE ELECTROFORESIS.....	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
ALBÚMINA HUMANA.....	16
FACTOR VIII DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE HUMANA.....	17
INMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL PARA EL USO INTRAVENOSO.....	17
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	18

RESUMEN.

La electroforesis es una técnica de separación basada en la migración de partículas cargadas en el seno de un campo eléctrico. Fue introducida por el químico sueco Arne Tiselius (Premio Nobel en 1948)⁴ y contribuyó a separar las proteínas presentes en los fluidos biológicos, dando un lugar a importantes avances en la investigación bioquímica y en medicina.

Los hemoderivados son medicamentos elaborados para tratar patologías deficitarias, por ejemplo la hipogammaglobulinemia congénita (déficit de inmunoglobulina G congénito) o la enfermedad de Von Willebrand (déficit en el factor VIII de coagulación). La Real Farmacopea Europea recoge los requisitos de pureza que deben de cumplir dichos hemoderivados, para que puedan ser administrados por vía intravenosa sin peligro para el paciente y para ejerzan el efecto terapéutico deseado. Los métodos electroforéticos propuestos en la Farmacopea permiten identificar las proteínas presentes en los diferentes hemoderivados, conocer su pureza y valorar actividad de los mismos.

Palabras clave: Real Farmacopea Europea, Hemoderivados, Electroforesis, Identificación, Ensayos de pureza

INTRODUCCIÓN.

La Real Farmacopea Europea (RFE)¹ recopila una serie de normas específicas, redactadas en forma de monografías, que describen el conjunto de procedimientos analíticos y criterios de aceptación realizados en cada componente de un medicamento. Permiten conocer su calidad y garantizar su uniformidad y pureza.

Aproximadamente el 70% de las monografías corresponden a productos de síntesis y excipientes. El resto de las monografías se refieren a las especificaciones que deben reunir las plantas medicinales y productos acabados como vacunas, antisueros, inmunoglobulinas, antitoxinas, productos biológicos, radiofármacos y hemoderivados.

Los hemoderivados^{14,15} son medicamentos constituidos por proteínas (albúmina, inmunoglobulinas y factores de coagulación) obtenidos a partir de plasma sanguíneo humano que debe satisfacer la monografía *plasma humano para fraccionamiento* (monografía 853⁵). Desde 1992 se utiliza la RFE para determinar la pureza y calidad de los hemoderivados que se aplicarán por vía intravenosa de forma general a los pacientes que los necesiten para tratar las diferentes patologías que padezcan^{1,3}.

OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión de los métodos de electroforesis reseñados en la Farmacopea Europea⁶, utilizados para conocer la calidad de los hemoderivados, con diferentes finalidades:

1. La identificación del producto, es decir, discriminar inequívocamente que el compuesto en estudio se ajusta a la definición dada en la etiqueta.
2. El análisis de impurezas que se deben encontrar en el hemoderivado en concentraciones muy bajas (por ejemplo activador de la precalicreína, Al, K Na) o deben estar ausentes (anticuerpos anti-VIH, antígeno de superficie de la hepatitis B).
3. La valoración de la actividad biológica de los factores de coagulación.

METODOLOGÍA.

FUNDAMENTO DE LA ELECTROFORESIS^{2,6}.

La electroforesis es un método físico de análisis usado con fines de separación o análisis que se basa en la migración de partículas coloidales cargadas, disueltas o dispersas en una disolución de un electrolito, cuando son sometidas a un campo eléctrico continuo. Las partículas cargadas positivamente se desplazarán hacia al cátodo, y las cargadas negativamente lo harán por tanto hacia el ánodo (figura 1). El proceso de electroforesis de las proteínas tiene lugar en un soporte inerte sólido (papel, gel..) embebido en una disolución tampón que permita mantener a las proteínas con una carga constante. Hay que tener en cuenta que las proteínas son compuestos anfóteros cuya carga depende del pH del medio.

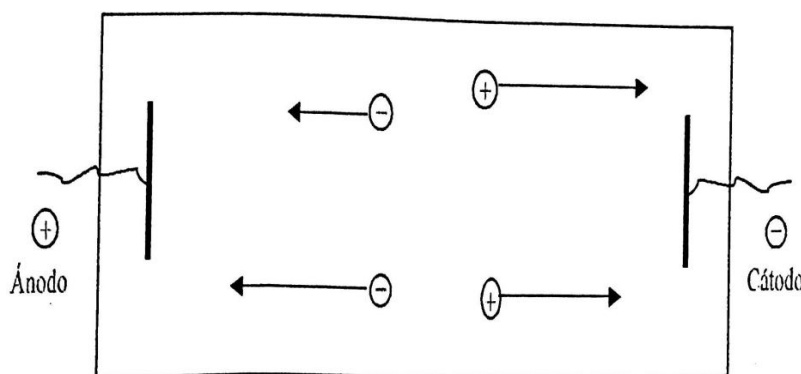


Figura 1.- Movimiento de las moléculas cargadas, bajo el efecto del campo eléctrico aplicado².

El movimiento de las partículas a través del soporte se explica gracias a la *movilidad electroforética*, que es la velocidad a la que se desplazan las partículas sobre el soporte. La movilidad electroforética para una partícula esférica, se representa con la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{Ze}{6\pi\eta r_i} \frac{KR}{(1+KR)}$$

siendo “Z” el número de unidades eléctricas de la carga, “e” la carga del electrón, “η” la viscosidad del medio, “r_i” el radio de la esfera, “K” el parámetro de Debye y Hückel, y “R” el radio de la atmósfera iónica. El parámetro de Debye y Hückel responde a la fórmula:

$$K = \sqrt{\frac{8\pi N e^2}{\epsilon k T}} \sqrt{I}$$

siendo “ε” la constante dieléctrica del medio, “I” la fuerza iónica del medio, “k” la constante de Boltzmann y “T” la temperatura absoluta.

Se deduce que la movilidad electroforética sólo se puede definir para una proteína de una naturaleza, tamaño y forma dadas, cuando se obtiene en unas condiciones exactamente controladas y descritas ya que se ve influenciada por numerosos factores dependientes de:

- El líquido (disolución tampón) en el que se desplaza la partícula: disolvente, naturaleza de los iones y concentración del tampón, fuerza iónica, pH, viscosidad.
- Parámetros experimentales: campo eléctrico aplicado (diferencia de potencial), temperatura.

La movilidad electroforética, en definitiva, está influenciada por cuatro fuerzas principales que actúan sobre la partícula, las cuales vienen representadas en la figura (2):

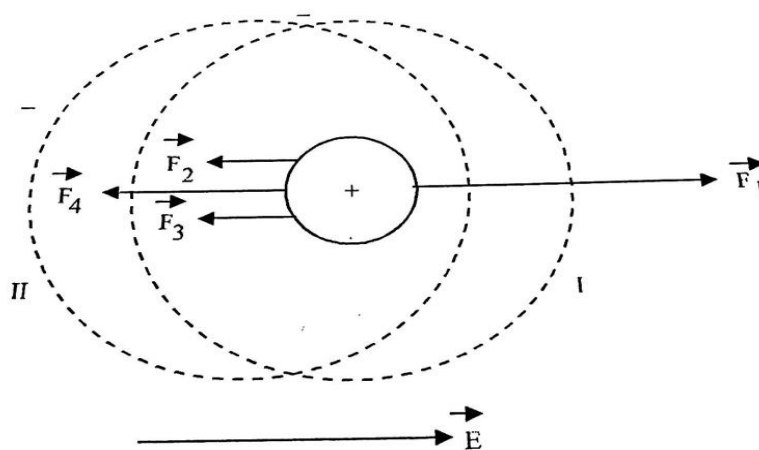


Figura 2. Esquema de las fuerzas que actúan en una partícula durante la electroforesis².

siendo F_1 la fuerza de atracción en el campo eléctrico a la que se opone F_2 o fuerza de retardo electroforético provocada por la propia disolución tampón. Se altera la distribución esférica de la atmósfera iónica que rodea a la partícula y como consecuencia se ejerce una fuerza de atracción entre la partícula y su atmósfera iónica (F_3 o fuerza de relajación). Además surge F_4 o fuerza de resistencia al campo eléctrico, debida a la viscosidad del medio.

En definitiva la velocidad de emigración o movilidad electroforética se verá condicionada por una gran cantidad de factores, pero tendrán especial importancia el tamaño y la forma de las proteínas. Cuanto más esféricas y de menor tamaño sean, mayor velocidad de emigración tendrán. Por ello los métodos de separación e identificación por electroforesis son útiles para separar las partículas cargadas, según su tamaño y forma.

TIPOS DE ELECTROFORESIS^{1, 2, 6}.

Tras explicar el fundamento del método, es importante mencionar cuales son las principales modalidades de electroforesis que se utilizan para el estudio de proteínas en los hemoderivados:

1. Electroforesis de zona:
 - Electroforesis sobre membrana de acetato de celulosa.
 - Electroforesis sobre gel de poliacrilamida.
2. Western Blot.

Electroforesis de zona^{2, 6, 7}.

En la electroforesis de zona se separan las partículas en función de su velocidad de migración. Es importante diferenciarla de la electroforesis de frente móvil, que carece de soporte inerte y se utiliza para determinar las movilidades electroforéticas. Para el análisis de hemoderivados se utiliza La electroforesis de zona denominada así porque se lleva a cabo sobre un soporte inerte, que puede ser de papel, de acetato de celulosa o de diferentes geles, como el gel de agar, almidón o poliacrilamida. Esto supone una serie de ventajas como, por ejemplo, que se impide la distorsión de la distribución electroforética producida por los cambios de temperatura o por la elevada densidad del disolvente, además de la posibilidad de usar menos cantidad de muestra y la separación completa de los componentes.

El material necesario para llevar a cabo la electroforesis de zona se muestra en la Figura 3:

- Fuente de alimentación o generador de corriente continua cuyo voltaje sea controlable y permanezca estable.

→ Cubeta de electroforesis: Tendrá normalmente forma paralelepípeda y podrá ser de vidrio o de plástico rígido. Consta de dos compartimentos separados (anódico y catódico) que contienen la solución amortiguadora adecuada para mantener el pH constante. El nivel de líquido debe de ser el mismo en ambos compartimentos, para evitar efectos de sifonación. En cada compartimento estará sumergido un electrodo de platino o de grafito, conectados mediante un circuito aislado de forma correcta, al correspondiente borne del generador.

La cubeta de electroforesis estará cerrada herméticamente con una tapa para evitar la evaporación de la disolución durante el proceso. Además se usan dispositivos de seguridad que garantizan que la corriente está desconectada cuando se levanta la tapa del sistema.

→ Dispositivo soporte de diferentes materiales, situado entre ambos compartimentos y sobre el que se depositará la muestra problema y los patrones.

→ Detector: para registrar y cuantificar las zonas separadas.

→ Colorantes para marcar los desplazamientos de las partículas.

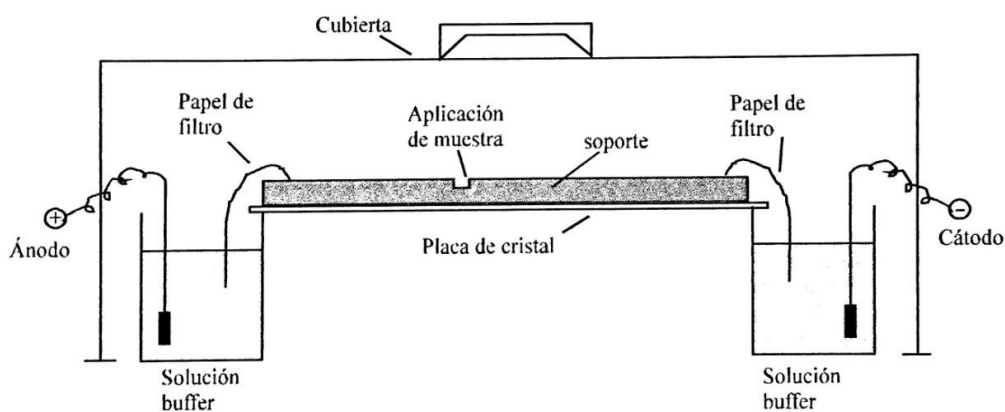


Figura 3. Esquema del material necesario para la electroforesis de zona².

Las propiedades que debe de tener el material soporte son las siguientes: no debe presentar grupos ionizables, además de ser químicamente inerte (no interaccionará ni con las muestras ni con el líquido amortiguador); tiene que ser aparte resistente a la humedad, presentar homogeneidad química y física, y ser económico y no sobrecalentarse durante la electroforesis (para lo cual puede contar con un sistema de refrigeración). Las precauciones que se deben de tener con dicho material son que la cantidad de muestra sea del orden de microgramos, además de que los efectos de electrólisis sean los mínimos. También hay que vigilar la intensidad del campo eléctrico, puesto que una intensidad de corriente alta da lugar a la producción de calor que resulta perjudicial para el sistema, ya que aumentan los fenómenos de difusión que influyen en la nitidez de la separación y puede ser un riesgo por la degradación de solutos termolábiles. Hay que estandarizar el método seguido, para la interpretación del resultado

analítico tanto cualitativo (a través de comparación con electroferogramas o por medio de test bioquímicos en el caso de las proteínas) como cuantitativo (a través de revelado de las muestras separadas con un colorante apropiado, y posterior lectura densiométrica de las zonas separadas).

Procedimiento: Se introduce la disolución del electrolito en los compartimentos. Se impregna el soporte en la solución electrolítica y se coloca en la cubeta de electroforesis. Se marca la línea de partida y se deposita la muestra en el soporte. Posteriormente conectamos la corriente eléctrica durante el tiempo necesario, y después desconectar la misma, retirar el soporte de la cubeta y dejar que se seque. Por último se lleva a cabo el revelado.

Electroforesis de zona sobre membrana de acetato de celulosa.

Se caracteriza porque en el soporte utilizado, los grupos hidroxilo de la celulosa están unidos a un grupo acetilo (para evitar los problemas de adsorción que da lugar a la distorsión de las bandas). En cuanto a la cuantificación de proteínas, presenta la ventaja de que se disuelve fácilmente en varios disolventes, lo que hace más fácil recuperar los componentes separados después de la electroforesis. Además facilita la determinación fotométrica de los componentes teñidos por un colorante porque se transparenta y permite ver los mismos. El principal inconveniente es que su resolución es baja (una banda puede tener varios constituyentes de la muestra). Se utiliza de forma rutinaria en el laboratorio de análisis clínicos para la separación y análisis de proteínas en fluidos biológicos, puesto que se necesitan pequeñas cantidades de muestra (microlitros), y el tiempo de análisis es corto. Además la técnica utilizada es sencilla y fácilmente reproducible. En muchas ocasiones esta técnica se encuentra automatizada.

Electroforesis de zona sobre geles.

Esta modalidad resuelve los problemas de la electroforesis de zona realizada sobre membrana de acetato de celulosa como la adsorción, la difusión y la poca resolución en la separación. Un gel es una red polimérica tridimensional, formada por polímeros con enlaces cruzados que deben de ser inertes para no interactuar con las moléculas de la muestra.

Los geles utilizados en electroforesis (poliacrilamida, agarosa y almidón) son retículos de moléculas poliméricas embebidos y rodeados de la sustancia amortiguadora. Entre las moléculas del gel quedan una serie de espacios, que constituyen los poros del mismo. El tamaño de los poros será menor cuanto mayor sea la concentración del polímero. Por ello, durante la electroforesis las partículas cargadas se moverán con una resistencia friccional que

depende del tamaño de la partícula. Las moléculas de tamaño menor que los poros del gel se mueven más deprisa que las de mayor tamaño que los poros del gel. Es por esto por lo que los geles permiten un efecto de tamizado cuando las moléculas se desplazan sobre su superficie (Figura 4).

El principal problema que puede presentar la electroforesis de zona sobre geles es que una molécula grande con carga neta alta puede desplazarse a la misma velocidad que una molécula pequeña con baja carga neta, de forma que aparecerán en la misma banda tras la separación electroforética.

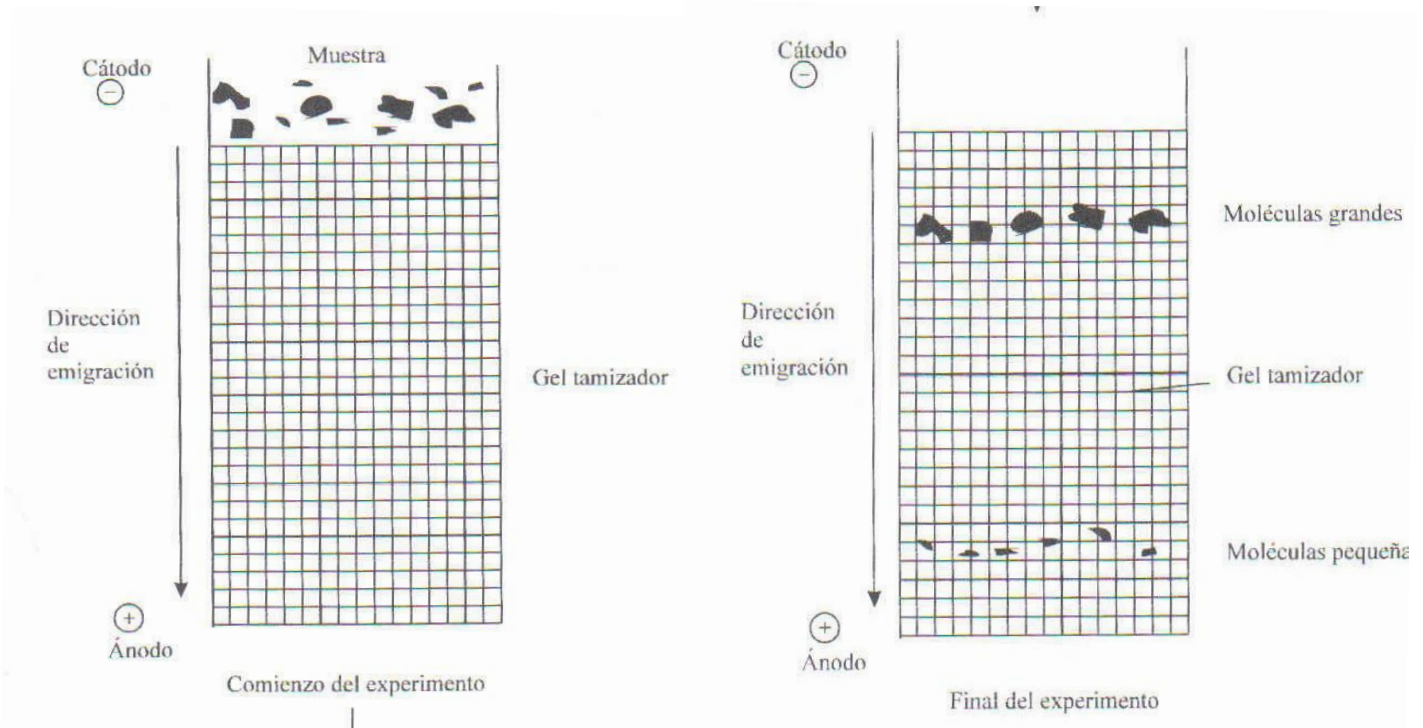


Figura 4. Comienzo y final del proceso electroforético en un gel tamizador⁴.

El gel de poliacrilamida² es sin duda alguna el soporte más usado en electroforesis, pues es el que mejores resultados proporciona para el análisis de sustancias bioquímicas. Son geles preparados por polimerización de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida. Presente buena resistencia mecánica, porosidad reproducible, no se dan fenómenos de adsorción o electroósmosis, la difusión además es mínima. Por otra parte tiene una estabilización hidrodinámica excelente, además presenta la posibilidad de ser utilizado con una gran variedad de soluciones amortiguadoras. Permite además analizar muy pequeñas cantidades de muestra (0,1 microgramos), y tiene transparencia natural.

En la preparación del gel compuesto se tienen en cuenta tanto la concentración del gel como el grado de reticulación del mismo.

La concentración del gel tendrá influencia sobre las propiedades mecánicas y sobre la porosidad (los de baja concentración serán más frágiles y difíciles de manejar; se aumenta su firmeza añadiendo un sólido inerte como la sacarosa). El grado de reticulación influye sobre el tamaño de poros. Existen dos formas de preparar el gel de poliacrilamida, en tubos (gel cilíndrico) o en capa fina sobre una placa de vidrio. Para la separación en geles de poliacrilamida se utilizan cubetas de metacrilato de metilo con dos reservorios situados verticalmente destinados a contener la disolución tampón y provistos cada uno con un electrodo de platino (ver Figuras 5 y 6).

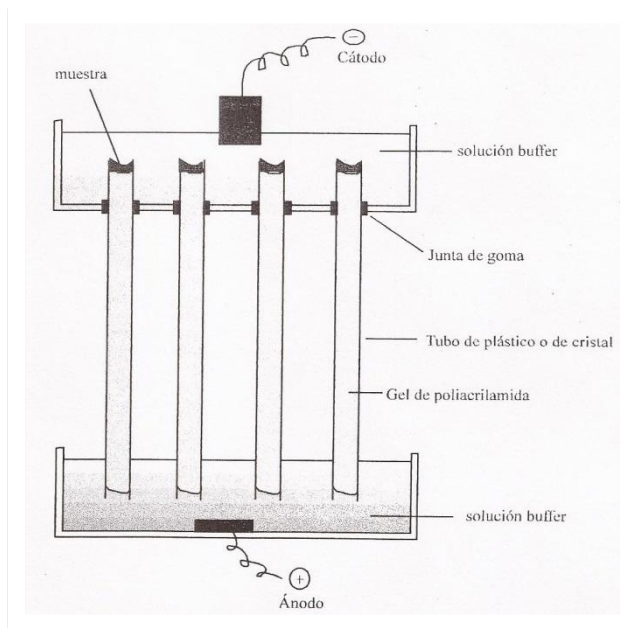


Figura 5. Electroforesis en gel

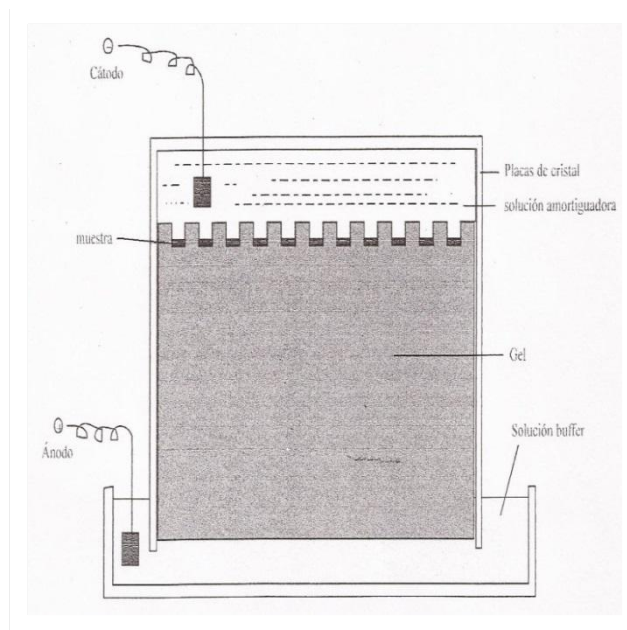


Figura 6. Electroforesis en gel en capa fina.

Las ventajas de la electroforesis de gel en columna son que se necesita menor cantidad de gel, por tanto resulta más barato, y además se utiliza un tubo para cada muestra. En cambio las ventajas de la electroforesis de gel en capa fina son que se disipa mejor el calor, tiene mayor poder de resolución y se puede preparar en horizontal o vertical.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS⁷.

Esta modalidad de electroforesis en gel de poliacrilamida se caracteriza por usar un detergente SDS (dodecil sulfato sódico) cuya estructura es $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$. Se utiliza para que el anión del dodecil se una a las proteínas y las desnaturalice por completo, rompiendo las interacciones no covalentes. Los grupos alifáticos dodecil se sitúan en el interior,

mientras que los grupos sulfato se colocarán en la superficie. Por tanto todos los complejos SDS-proteína toman la misma carga negativa.

Este método se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas ya que la separación electroforética depende solo del tamaño de la proteína, no de la carga. Para obtener el peso molecular se utilizan patrones y se contrastan las movibilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido con las correspondientes a las proteínas problema.

Inmunotransferencia Western Blot⁹.

Combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmunoquímica. En estos ensayos el antígeno es sometido primeramente a una electroforesis SDS-PAGE y luego es transferido mediante corriente eléctrica a un de papel de nitrocelulosa o a una membrana de fluoruro de polivideno, PVDF, de modo que constituyen la fase sólida a la que se une el antígeno.

Es en el soporte donde las proteínas separadas (antígenos) son reconocidas por anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de ellas. Los primeros tienen la ventaja de ser específicos en sus interacciones porque se unen solamente a un epítipo en particular (a una única región del antígeno) y su inconveniente es que en algunos casos se produzcan reacciones cruzadas con otros polipéptidos. Los anticuerpos policlonales se caracterizan porque sus incluyen múltiples moléculas de anticuerpo que se unen a antígenos concretos específicos.

Una vez realizada la transferencia, se lleva a cabo una tinción reversible, que permite visualizar los complejos antígeno-anticuerpo. Se destiñe después con agua destilada. Las membranas con el material transferido se bloquean, para que no se produzcan uniones inespecíficas del anticuerpo que se utiliza en la técnica. Tras el bloqueo, las proteínas inmovilizadas en la membrana se incuban con anticuerpos primarios específicos que identifican y cuantifican las proteínas concretas de una mezcla compleja de proteínas.

Posteriormente se lleva a cabo la detección, que se puede realizar con un marcador radiactivo del anticuerpo secundario que se va a unir al complejo antígeno-anticuerpo primario, o con anticuerpos secundarios que se unan a regiones del antígeno a las que no se hayan unido los anticuerpos primarios. Dichos antígenos secundarios tendrán actividades enzimáticas conjugadas, como la actividad fosfatasa alcalina y la actividad peroxidasa. Tras la unión de los anticuerpos secundarios con los antígenos se generan sustratos luminiscentes (su detección es muy rápida y sensible (Figura 7)).

Para la detección de anticuerpos anti-VIH en hemoderivados, la técnica de referencia es la Inmunotransferencia Western Blot (Figura 8), Aunque resulte una técnica más compleja y costosa que el ELISA.

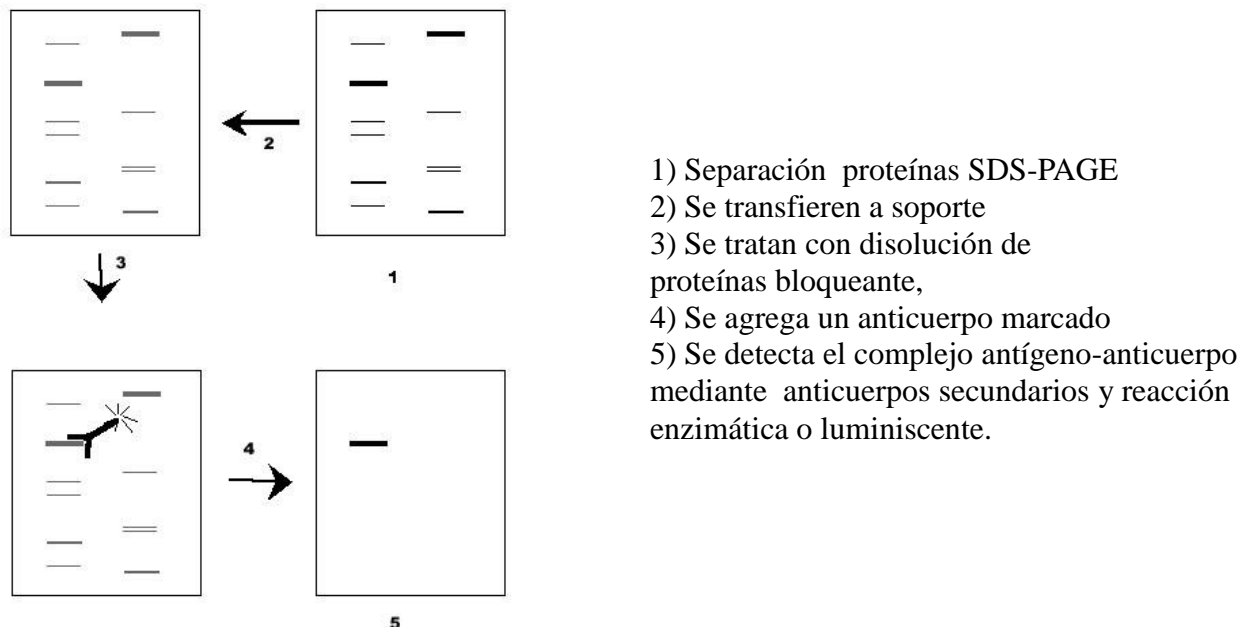


Figura 7. Fases de inmunotransferencia Western Blot⁹

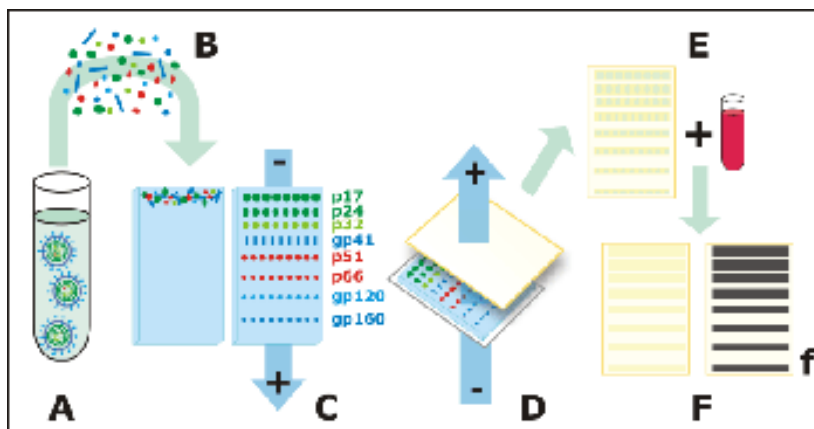


Figura 8. Inmunotransferencia Western Blot para la detección de anticuerpos de VIH.

- A) Cultivo tisular de VIH.
- B) Lisado celular y obtención de proteínas.
- C) Electroforesis en gel de poliacrilamida (las proteínas migrarán según su tamaño y características debido al campo eléctrico).
- D) Transferencia de las proteínas a un papel de nitrocelulosa.
- E) Incubación del papel con suero del paciente.
- F) Si existen anticuerpos anti VIH en el suero, éstos se unirán fuertemente a las proteínas transferidas al papel y se detectarán como bandas oscuras (f).

Inmunolectroforesis.

Basada en la reacción antígeno-anticuerpo. En primer lugar se separan las moléculas de antígeno por electroforesis de zona, sobre un gel de agarosa al 1-1,5%. Se desconecta la fuente de alimentación, y después se sitúa el antisuero apropiado en unos canales paralelos a la dirección de separación electroforética.

Posteriormente se coloca en una cámara húmeda a temperatura constante insertando previamente el anticuerpo de la proteína objeto de estudio en unos canales apropiados. Los antígenos y anticuerpos difunden en el interior del gel. Cuando el antígeno reacciona con la cantidad adecuada de anticuerpo, aparece la precipitina como una línea curvada hacia los canales de anticuerpos. Al terminarse la formación de precipitina, el gel se podrá lavar con disolución salina para separar el material que no haya precipitado. Se podrán teñir las líneas de precipitación con un colorante apropiado.

Permite analizar cantidades pequeñas de proteínas individuales en mezclas. Además, utilizando un antisuero (con mezcla de varios anticuerpos) se puede analizar la pureza en preparaciones proteicas, por confirmación de la presencia de un único antígeno y la confirmación de la ausencia de otros antígenos que no nos interesen. La sensibilidad de detección puede mejorarse tiñendo el halo de precipitación (con fluoróforos o luminóforos) o marcando radiactivamente el Ag o el Ac (radioinmunoensayo) o con una enzima (enzimoinmunoensayo).

Para que los resultados de la valoración sean fiables, será esencial estandarizar los componentes del inmunoensayo y utilizar, cuando sea posible, las preparaciones internacionales de referencia para inmunoensayos. Es por ello que muchos de los reactivos necesarios se hallan disponibles como "kits" comerciales, donde además se incluyen los materiales necesarios y las instrucciones para su correcto uso.

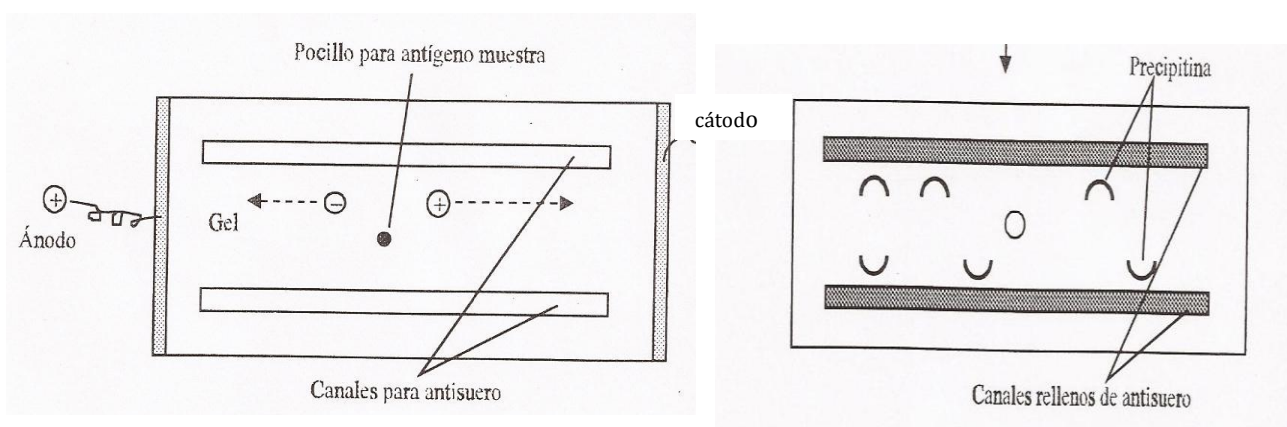


Figura 9. Proceso de inmunolectroforesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tras hacer un profundo estudio sobre las diferentes variaciones de electroforesis utilizadas para el control de calidad de diferentes proteínas en hemoderivados, es importante conocer cuál es la aplicación directa de dichas técnicas.

Los hemoderivados^{14,15} son especialidades farmacéuticas cuyo principio activo procede de la sangre de donantes sanos a través de un proceso de fraccionamiento y purificación adecuados. Se caracterizan por tener una estructura proteica compleja, lo cual obliga a que su administración sea exclusivamente parenteral en la mayoría de los casos. Las ventajas que proporcionan los hemoderivados frente a otros medicamentos son que disminuyen las reacciones adversas, evitan la sobrecarga circulatoria (al administrarse pequeños volúmenes), presentan mayor eficacia en la obtención (porque de una unidad de sangre completa podemos obtener varios hemoderivados). Además existe la necesidad de un tratamiento específico para determinadas patologías, lo cual se consigue a través de los mismos; de ahí su extenso uso.

Antes de que un hemoderivado pase a considerarse como una especialidad medicamentosa, es necesario que cumpla unos criterios de aceptación recogidos en su monografía específica de la Real Farmacopea Española. Dichas especificaciones o estándares de calidad permiten conocer su calidad y garantizar que el medicamento cumple con las exigencias de uniformidad y pureza. Las monografías de los diferentes hemoderivados recogen una definición de la sustancia, el método de producción de la misma, sus características, su identificación, ensayos y valoraciones que se realizan a los mismos, exigencias de etiquetado e impurezas de las mismas.

Para ello es importante diferenciar algunos términos:

~ Identificación de hemoderivados: Sirven para cerciorarnos de que las preparaciones contienen solo proteínas de origen humano. El componente principal del hemoderivado siempre será el que se corresponde con la monografía en cuestión (albúmina humana, inmunoglobulina G, etc.).

~ Ensayos: El objetivo de la utilización de los mismos es detectar las impurezas que puedan proceder de la fabricación, de la degradación del producto, o que hayan podido ser introducidas por adulteración. Se prestará principal atención a los compuestos tóxicos y las que alteren la actividad o estabilidad de las sustancias. Ensayos en hemoderivados en los que se utiliza la electroforesis como herramienta para la identificación de proteínas:

→ Ensayo de composición proteica: Se usan técnicas de electroforesis de zona, inmunodifusión o inmunolectroforesis.

→ Ensayo de distribución del tamaño molecular: Se usa la electroforesis sobre gel de poliacrilamida SDS.

~ Valoración: La finalidad de una valoración es determinar la concentración de la sustancia y/o la actividad biológica de la misma. Se utilizan cuando en los ensayos cualitativos no se refleja la actividad biológica, o cuando la muestra tiene una composición compleja, o si los ensayos cuantitativos no son muy exactos. Valoraciones en hemoderivados:

→ Valoración del número y la cantidad relativa de los diferentes multímeros del Factor VIII de coagulación de la sangre humana: Se usan técnicas de electroforesis en gel de agarosa SDS, con o sin inmunotransferencia Western Blot.

Para la identificación de proteínas en hemoderivados, por tanto, se usan ensayos que discriminan inequívocamente que el compuesto estudiado se adapta a la definición recogida en la etiqueta. Para ello muchos ensayos recogidos en diferentes monografías requieren el uso de sustancias o preparaciones de referencia. Estas preparaciones se obtienen en la secretaría técnica de la Comisión Europea de Farmacia, y son establecidos por la Organización Mundial de la Salud. Debido a que estos materiales de referencia están disponibles en cantidades limitadas, la Comisión ha establecido Preparaciones Biológicas de Referencia (PBR) solamente en casos apropiados. La actividad de las preparaciones biológicas de referencia se expresará en Unidades Internacionales (U.I) siempre que se pueda.

Por ello se procede a estudiar las monografías recogidas en la Real Farmacopea Europea sobre la albúmina humana, el factor VIII de coagulación de la sangre humana, y la inmunoglobulina humana normal para el uso intravenoso.

Disolución de Albúmina humana¹⁰. (Monografía 0255 de la RFE).

Es una disolución acuosa que satisface la monografía *Plasma humano para fraccionamiento (0853)*. Se trata de un líquido límpido, ligeramente viscoso, casi incoloro, amarillo ámbar o verde. Se someterá la muestra, como ha sido mencionado anteriormente, a dos principales ensayos de identificación mediante técnicas electroforéticas:

Ensayo de composición proteica: A través de electroforesis de zona en tiras de gel de acetato de celulosa, utilizando una disolución tampón de barbital como disolución de electrolitos. Se compara la composición proteica de una disolución de referencia de albúmina humana para electroforesis (PBR) con la disolución problema que se quiere examinar. Tras el desplazamiento de las proteínas por el gel, se mide la absorbancia de las bandas generadas en el mismo, y tiene

que cumplirse que al menos el 95% de la muestra examinada está compuesta por albúmina humana.

Ensayo de distribución de tamaños moleculares: La Real Farmacopea Europea propone examinar la muestra por cromatografía de líquidos, pero también se puede llevar a cabo la electroforesis de zona sobre gel de poliacrilamida SDS (Se ha demostrado que la electroforesis con respecto a la cromatografía, en general, tiene la ventaja de que es más rápida, menos costosa y contaminante. En cambio la cromatografía resulta ser más reproducible, repetible y sensible que la electroforesis. Por tanto la elección de la técnica dependerá de los intereses del laboratorio¹⁶).

Es importante también comprobar que el hemoderivado en cuestión (albúmina humana) cumple el resto de ensayos, como por ejemplo el de esterilidad o el de pirógenos. Dicho hemoderivado se utilizará en aquellos pacientes que padezcan procesos agudos y crónicos con hipoalbuminemia. Se utilizará como expansor del plasma en tratamiento del shock y otras situaciones de hipovolemia. Se usa como expansor también en enfermedades hepáticas agudas y crónicas con ascitis. También se usa para tratar la hiperbilirrubinemia neonatal¹⁵.

Factor VIII de la coagulación sanguínea humana^{11,12} (Monografía 0275 de la RFE).

Es factor VIII de coagulación de la sangre humana es una fracción proteica del plasma que contiene una glicoproteína, el factor VIII de coagulación o factor de von Willebrand, y dependiendo del método de preparación distintas cantidades del mismo. Se prepara a partir de plasma humano que satisfaga los requisitos de la monografía *Plasma humano para fraccionamiento (0853)*. En dicha preparación es importante que la actividad del factor VIII no sea inferior a 20 U.I por mililitro.

El mencionado hemoderivado podrá ser utilizado para tratar a un paciente con enfermedad de von Willebrand si cumple el ensayo de va del factor de von Willebrand humano (en la que se valora el número y la cantidad relativa de los diferentes multímeros). Esta se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), con o sin inmunotransferencia western sobre nitrocelulosa, utilizando como referencia una mezcla de plasmas humanos normales.

Este hemoderivado se usará principalmente para tratar a los pacientes que padezcan la enfermedad de Von Willebrand y no responden a desmopresina, usándose además en pacientes con coagulopatías adquiridas (pacientes con hemorragias frecuentes, pacientes que presenten sangrado espontáneo o experimenten un accidente hemorrágico, y en intervenciones quirúrgicas)¹⁵.

Inmunoglobulina humana normal para el uso intravenoso¹³ (Monografía 0918 de la RFE).

La inmunoglobulina humana normal para uso intravenoso contiene los anticuerpos IgG de personas sanas. Se obtiene a partir de plasma que cumpla con los requisitos establecidos en la monografía *Plasma humano para fraccionamiento (0853)*.

Está indicada para el tratamiento de inmunodeficiencias primarias (agammaglobulinemia primaria, hipogammaglobulinemia congénita, etc.), secundarias (Hipogammaglobulinemia secundaria en paciente con leucemia linfocítica crónica por ejemplo), para el tratamiento de niños con SIDA que tengan infecciones bacterianas de repetición y para el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas cuando esté disponible la inmunoglobulina específica en los casos en que la primera estuviera indicada¹⁵. La preparación líquida es límpida o ligeramente opalescente e incolora o amarilla pálida. La preparación liofilizada tiene el aspecto de un polvo, o una masa sólida y friable, blanco o ligeramente amarillento.

Los ensayos son los mismos que los que se utilizan para identificar las proteínas en el preparado de albúmina humana.

CONCLUSIÓN.

Por tanto queda demostrada la importancia de la electroforesis a la hora de identificar y verificar la pureza en los hemoderivados elaborados para ser administrados por vía parenteral a los pacientes en función de las patologías que padezcan. Así queda justificada la necesidad de que las diferentes modalidades de electroforesis se encuentren recogidas en la Real Farmacopea Europea y constituyan métodos especificados en el control de calidad de los hemoderivados.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE.
2. Valls, O; del Castillo, B. y col, Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. 4ª edición. Pag 413-438. España: Barcelona Piros D.L; 1998.
3. Eur-lex.europa.eu [Internet]. España: EUR-lex; 1994 [actualizado 8 Abr 2014; citado el 14 Mar 2018].
Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=LEGISSUM:121161>
4. Fernández Santarén, J. De la tesis doctoral de Tiselius a la proteómica: setenta y cinco años de electroforesis de proteínas. Arbor. 2004; CLXXVII (698): 259-284.

5. Monografía “Plasma humano para fraccionamiento” (853). Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE.
6. Apartado “Electroforesis” incluido en el capítulo de Aparatos. Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE. Capítulo 2.2.31, pags 43-49.
7. Martín García Pérez, H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG 2000; 1(2):31-41.
8. Westermeier R et al. Electrophoresis in Practise: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. Fourth edition. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2005.
9. De la Fuente Gonzalez, A. Rodríguez Lozano, J. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (*Western blot*). Técnicas de diagnóstico. 2007; 22(5):252-8.
10. Monografía “Disolución de Albúmina Humana” (255). Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE. Pags 667-669.
11. Monografía “Factor VIII de Coagulación de la Sangre Humana” (275). Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE. Pags 3043-3045.
12. Monografía “Valoración del Factor Von Willebrand Humano”. Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE. Capítulo 2.7.21, pags 180-181.
13. Monografía “Inmunoglobulina Humana Normal para uso intravenoso” (918). Real Farmacopea Española, 2002. 2ª Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE. Capítulo 2.7.9, pag 1662-1664.
14. Viñals Florez, L.M. ¿Qué son y para que se usan los hemoderivados?. RCCV. 2007; Vol. 1 (2).
15. Bonilla, M. 2005. *Farmacoterapia con Hemoderivados*. Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Severo Ochoa, Madrid.
16. Cala Molina, M.P, Vásquez Cardeno, A.M. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias; 2008.