



Revista Alergia México

ISSN: 0002-5151

revista.alergia@gmail.com

Colegio Mexicano de Inmunología Clínica
y Alergia, A.C.
México

Guidos-Fogelbach, Guillermo Arturo; Paredes-Aguilar, Jorge Antonio; Colín-Martínez,
Nayeli Montserrat; Rojo-Gutiérrez, María Isabel; López-Hidalgo, Marisol; Reyes-López,
César Augusto Sandino

Determinación y análisis del perfil proteico de diferentes factores de transferencia

Revista Alergia México, vol. 63, núm. 4, octubre-diciembre, 2016, pp. 365-372

Colegio Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia, A.C.

Ciudad de México, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=486755026006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Determination and analysis of protein profile of different transfer factors

Determinación y análisis del perfil proteico de diferentes factores de transferencia

Guillermo Arturo Guidos-Fogelbach,¹ Jorge Antonio Paredes-Aguilar,¹ Nayeli Montserrat Colín-Martínez,¹ María Isabel Rojo-Gutiérrez,² Marisol López-Hidalgo,¹ César Augusto Sandino Reyes-López¹

Abstract

Background: The transfer factor (TF) is the dialyzable extract of leukocytes with cellular immunity transfer properties. Its use has spread in the treatment of a wide range of immunologic, infectious, and even oncological diseases. However, important aspects in their protein profile, component concentrations, and a well-defined action mechanism are not completely unknown.

Objectives: To analyze the protein profiles of different transfer factors marketed in Mexico.

Methods: 6 TF marketed in Mexico were obtained and analyzed, quantifying protein with thaze Bradford method, by high-performance liquid chromatography (HPLC), and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). All samples were analyzed in duplicate.

Results: The total protein concentrations of all TF analyzed are less than 0.2 mg/mL. The chromatographic profiles showed differences in some TF. The protein concentration was 6 to almost one thousand times lower compared to reports by some manufacturers.

Conclusion: Almost all transfer factors marketed in Mexico lack a labeling and health record that meets the official standards.

Keywords: Transfer factor; Protein analysis

Este artículo debe citarse como: Guidos-Fogelbach GA, Paredes-Aguilar JA, Colín-Martínez NM, Rojo-Gutiérrez MI, López-Hidalgo M, Reyes-López CAS. Determinación y análisis del perfil proteico de diferentes factores de transferencia. Rev Alerg Mex. 2016;63(4):365-372

¹Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Laboratorio de Bioquímica Estructural. Ciudad de México, México

²Secretaría de Salud, Hospital Juárez de México, Servicio de Alergia e inmunología. Ciudad de México, México

Correspondencia: Guillermo Guidos-Fogelbach.
guillermoguidos@yahoo.com

Recibido: 2016-05-26

Aceptado: 2016-09-21



Resumen

Introducción: El factor de transferencia (FT) es el extracto dializable de leucocitos con propiedades de transferencia de inmunidad celular. Su uso se ha extendido en el tratamiento de una amplia gama de padecimientos inmunológicos, infecciosos y como coadyuvante de padecimientos oncológicos. A pesar de ello, no se conocen completamente aspectos importantes de su perfil proteico, concentraciones de componentes y mecanismos de acción.

Objetivos: Analizar los perfiles proteicos de diferentes factores de transferencia comercializados en México.

Métodos: Se obtuvieron y analizaron 6 FT comercializados en México. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Resultados: Las concentraciones de proteínas totales de todos los FT analizados fueron menores de 0.2 mg/mL. Los perfiles cromatográficos mostraron diferencias en algunos FT. La concentración de proteínas resultó de 6 hasta casi mil veces más baja en comparación con lo informado por algunos fabricantes.

Conclusión: Casi la totalidad de los factores de transferencia comercializados en México carecen de un etiquetado y registro sanitario que cumpla con las normas oficiales vigentes.

Palabras clave: Factor de transferencia; Análisis proteico

Abreviaturas y siglas

AMPC, adenosin monofosfato cíclico

FT, factor de transferencia

FTE, factores de transferencia específicos

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución

IL-2 α , receptor α para interleucina 2

IL-6, interleucina 6

IL-8, interleucina 8

INF γ , interferón γ

NF- κ B, factor nuclear κ B

SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

TFA, ácido trifluoroacético

TLR 2, receptor tipo toll 2

TNF α , factor de necrosis tumoral α

TRL 4, receptor tipo toll 4

Introducción

El factor de transferencia (FT), descrito por Henry S. Lawrence en 1949, es un conjunto de alrededor de 200 moléculas peptídicas con funciones moduladoras del sistema inmunológico con un peso molecular menor a 10 kDa, actúan sobre los canales de calcio como mensajeros que transmiten información inmunológica producida por los linfocitos T como parte de la inmunidad celular. En 1956, H. S. Lawrence y Pappenheimer describieron que el FT era capaz de transmitir memoria inmunitaria de forma independiente de la inmunidad humoral dada por los anticuerpos.¹⁻⁴

Charles H. Kirkpatrick identificó la secuencia consenso de aminoácidos del FT y describió que era altamente conservada, independientemente de las fuentes y especies de obtención.^{5,6}

En la actualidad, los FT se purifican, liofilizan y se encapsulan para su consumo. Los preparados de FT pueden incluir productos completos o parciales gracias a tecnologías de microfiltración.⁶ Los extractos de FT son complejos y contienen más de 200 moléculas con pesos moleculares de 1 a 20 kDa; algunas de estas son proteínas con pesos moleculares entre 3.5 y 5 kDa específicas de antígeno, que se denominan factores de transferencia específicos (FTE).

En la práctica clínica, el FT se emplea como un adyuvante inmunológico para el manejo de una amplia gama de enfermedades que van desde hipersensibilidades tipo 1, inmunodeficiencias primarias y secundarias, cáncer, procesos infecciosos, alteraciones cutáneas, entre otros, por lo que su uso y

comercialización se ha masificado en México y en otros países.⁷⁻¹⁹

A pesar de esto, su mecanismo de acción no se encuentra totalmente esclarecido, pero se postula que está implicada la modificación de la señalización de la respuesta inmune innata (\uparrow TLR 2, \uparrow TRL 4, \uparrow IL-2 α , NF- κ B), lo que origina la elevación de los niveles de TNF α , IL-6, IL-8, INF γ y AMPc,²⁰⁻²² sin embargo, no se cuenta con una regulación de las fuentes de obtención, composición proteica y esquemas terapéuticos.²²

Objetivos

Analizar los perfiles proteicos de los diferentes FT comercializados en México por los siguientes métodos: cuantitativo de Bradford, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Estructural, Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México. Se obtuvieron extractos comerciales de los principales FT comercializados en México, los cuales se identificaron como. Immunoactive®, Terrat®, Transferon® solución oral, Extracto dializado de leucocitos®, Celestine®, G-nomic®; y se asignaron de forma aleatoria con los literales A, B, C, D, E y F.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales en los productos se realizó mediante una técnica colorimétrica utilizando el reactivo de Bradford²³ (Sigma-Aldrich™, US) con-

forme a las instrucciones del fabricante. Para la obtención de las concentraciones de las muestras se realizó un curva-patrón a una concentración máxima de 1 mg/mL, con una solución de albúmina de concentración conocida (Pierce BCA, Protein Assay Kit™, Thermo Fisher Scientific, US). Las absorciones de cada estándar y de las muestras se obtuvieron en un espectrofotómetro Scinco™ S-3100 (Seúl, Corea) a 595 nm. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)

El perfil cromatográfico de cada muestra se obtuvo en un HPLC Infinity LC 1220™ (Agilent Technologies, US), con una columna de fase reversa 300-SB-C18 (Zorbax™, Agilent Technologies, US), partícula de 5 μ m, con dimensiones de 2.1 x 50 mm.

Los cromatogramas fueron generados a 280 nm en un detector ultravioleta (Agilent Technologies, US) a un flujo de 0.8 mL/min⁻¹ de una solución de ácido trifluoroacético (TFA), a 0.12% en agua ultra-purificada (Milli Q™, Millipore Corporation, US) y la elución se realizó con un gradiente lineal de una solución de acetonitrilo + TFA a 0.1%. Todas las muestras fueron previamente filtradas y se analizaron por duplicado.

Perfil electroforético en geles de SDS-PAGE

El perfil electroforético de las proteínas en los FT probados se obtuvo según el procedimiento descrito por Laemmli,²⁴ en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida a 16% de concentración. En cada carril se aplicaron aproximadamente 20 μ g de proteínas totales. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250 con la técnica *silver blue*.

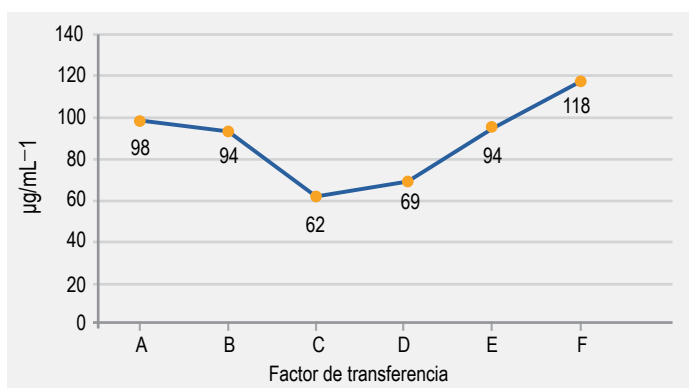


Figura 1. Análisis del contenido proteico de los FT estudiados, cuantificado por el método de Bradford. Los valores se obtuvieron a partir de una curva de referencia de un estándar de albúmina de concentración conocida.

Resultados

Las concentraciones proteicas de las diferentes muestras analizadas se observan en la Figura 1. Se muestra el promedio de dos determinaciones independientes.

Las concentraciones de proteínas totales declaradas por los fabricantes de los FT y las obtenidas por cuantificación mediante el método de Bradford se detallan en el Cuadro 1.

Perfil cromatográfico de los FT analizados

Los perfiles cromatográficos representativos para cada uno de los FT analizados se muestran en la Figura 2.

Perfil electroforético de los FT analizados

No fue posible obtener los perfiles electroforéticos de los FT analizados, ya que en las condiciones en que se realizó el experimento no se identificaron proteínas en los geles.

Discusión

En esta investigación analizamos los perfiles proteicos y cromatográficos de seis productos comerciales que contienen factor de transferencia proveniente de leucocitos humanos. Las concentraciones de proteínas totales de las muestras analizadas, determinadas mediante la técnica de Bradford varían en rangos de entre 62 a 118 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, que representan variaciones importantes entre los productos. De cada muestra

Cuadro 1. Concentraciones de proteínas totales descritas en las etiquetas de los FT analizados y las obtenidas por el método de Bradford

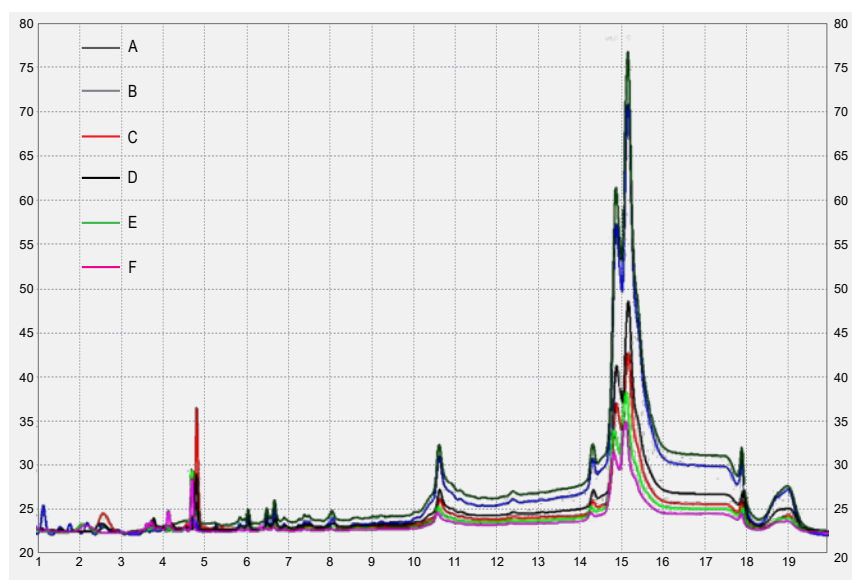
Factor de transferencia	Concentración declarada por el fabricante	Concentración por cuantificación de proteínas*
A	2.6 $\mu\text{g/mL}$	0.098 $\mu\text{g/mL}$
B	NE	0.094 $\mu\text{g/mL}$
C	0.4 $\mu\text{g/mL}$	0.062 $\mu\text{g/mL}$
D	NE	0.069 $\mu\text{g/mL}$
E	92 $\mu\text{g/mL}$	0.094 $\mu\text{g/mL}$
F	N/E	0.118 $\mu\text{g/mL}$

NE, no especificada en el producto; * Método Bradford

solo se analizó un lote, por lo que no fue posible determinar la variación de proteínas que pudiera presentarse entre lotes.

Destacó que solamente la mitad de los productos indicaba en su etiquetado o información de insertos la cantidad de proteína contenida en el envase. A partir de esta información se identificó que las concentraciones declaradas con las obtenidas experimentalmente difirieron en magnitud; el producto que presentó mayor diferencia en el FT fue el identificado como E, casi mil veces respecto a

Figura 2. Perfil cromatográfico de los FT analizados, a una absorbancia de 280 nm y a un tiempo de retención de 20 minutos. Los colores en los literales A a F representa cada uno de los FT.



la concentración señalada. El producto A presentó una diferencia de 26 veces y el C, de 6 veces. Estas variaciones en la concentración de proteínas entre los diferentes productos analizados podrían tener un impacto terapéutico significativo.

Perfiles cromatográficos

El análisis cromatográfico de las muestras analizadas mostró similitud entre ellas en los tiempos de retención de las fracciones más importantes, con variaciones en la magnitud de los mismos, seguramente como consecuencia de la diferencia en las concentraciones proteicas de las muestras.

Es importante destacar que los componentes principales de los FT se conservaron en la mayoría de los productos, sin embargo, existieron diferencias significativas en varias fracciones menores, principalmente en los tiempos de retención de 1 a 3 minutos. El producto F presentó las mayores variaciones en sus componentes, incluso un ligero desplazamiento en la fracción con tiempo de retención de 4.8 minutos, lo que podría indicar un componente diferente o alguna modificación que pudieran sufrir las proteínas de esa fracción. El producto E mostró también un tiempo de retención distinto en esta fracción, en comparación con lo observado para los otros FT analizados.

Adicionalmente, los productos E y F presentaron variaciones importantes en las fracciones con tiempo de retención de 6 a 8.5 minutos, con ausencia de algunas de ellas o presencia de otras. Si bien esto

puede explicarse en parte por las diferencias en las concentraciones de los productos, varias fracciones que no se encontraron en los FT más concentrados fueron claramente componentes diferentes, producto de las variaciones en los procesos de producción o en las fuentes de obtención de los productos. Debido a que se desconoció qué productos fueron los que tuvieron mayor impacto terapéutico, no fue posible establecer la importancia que podrían representar estas diferencias en la seguridad y eficiencia terapéutica.

En cuanto al perfil electroforético, en ninguno de los FT se pudo detectar bandas de proteínas en los geles, probablemente por la técnica empleada para la obtención del perfil y para la tinción del mismo. Sería conveniente emplear para este análisis gel para electroforesis de péptidos y una tinción con plata.

Por último, la revisión de la etiqueta de los productos mostró que ninguno contaba con la información requerida para un producto hemoderivado, como se especifica en la normatividad nacional vigente. La información mínima solicitada en la etiqueta de productos hemoderivados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos²⁵ y su cumplimiento por los fabricantes de FT analizados se describe en el Cuadro 2.

Los insumos farmacológicos, biológicos y biotecnológicos para el uso en humanos están regidos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y las normas oficiales mexicanas NOM-253-SSA1-2012²⁶ y NOM-072-SSA1-2012,²⁷ en las cuales se indican los requisitos sobre identidad, pureza,

Cuadro 2. Información escrita proporcionada por los diferentes fabricantes de FT

Factor de transferencia	Fuentes de obtención	Concentración de proteínas totales	Lote y caducidad	Registro sanitario	Responsable y lugar de fabricación
A	Leucocitaria sin especificación de origen	●	●	●	●
B	●	●	Información errónea	●	●
C (sublingual)	Leucocitaria sin especificación de origen	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●
F	Leucocitaria sin especificación de origen	●	●	●	●

● información no descrita en caja o en frasco; ● información proporcionada en el empaque o frasco

control de calidad de la sangre y sus hemoderivados y su etiquetado; los procesos para su elaboración se encuentran regidos en la NOM-059-SSA1-2015.²⁸

Por tratarse de un producto biológico hemoderivado, el FT debería cumplir con dicha regulación, sin embargo, en ninguno de los empaques o frascos de los 6 productos se indicaba el registro de elaboración y prescripción como medicamento; se declaraban como suplementos alimenticios, aun cuando se empleaban con fines terapéuticos (productos A, B, D, E y F), por lo que tendrían que apegarse a las NOM-SSA1-251-2009²⁹ y NOM-051-SCFI/SSA1-2010.³⁰

La normativa vigente también señala que en los hemoderivados se debe describir el contenido de elementos como adyuvantes y contenido de sodio, entre otros. En el análisis efectuado encontramos que únicamente los productos B y E cumplían al menos la descripción de la composición de adyuvantes; el producto E indicaba el contenido de sodio en su etiquetado. Adicionalmente, la NOM-253-SSA1-2012 señala que todos los productos hemoderivados deberán contener en su etiqueta la leyenda "la transmisión de agentes infecciosos no es totalmente descartado cuando son administrados productos preparados a partir de la sangre o plasma humano", algo que no presenta ninguno de los productos analizados.

Conclusiones

El empleo del FT se ha incrementado como un adyuvante para el manejo de diversas enfermedades, lo que ha promovido la creación de empresas para su fabricación que no cumplen con la legislación específica vigente respecto al etiquetado y disposición de los hemoderivados, al omitir información del registro sanitario, lugar de fabricación, fuentes de obtención y descripción detallada del contenido del FT. En nuestro estudio realizamos un análisis de los contenidos proteicos, perfiles cromatográficos y electroforéticos de 6 productos identificados como FT, así como de la información mínima en la etiqueta de los mismos que sustente con racionalización su empleo como coadyuvante terapéutico.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento especial al doctor Álvaro Pedroza Meléndez y a quienes nos proporcionaron muestras de los productos para su análisis. A Rubí Esmeralda Romo Rodríguez, por su asesoría y apoyo en las pruebas de laboratorio.

Referencias

1. Lawrence HS. The transfer in humans of delayed hypersensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J. Clin Invest.* 1955;34(2):219-232. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC438618/>
2. Dupont B, Ballou M, Hansen JA, Quick C, Yunis EJ, Good RA. Effect of transfer factor therapy on mixed lymphocyte culture reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;71(3):867-871. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/71/3/867.full.pdf>
3. Lawrence HS, Pappenheimer AM Jr. Transfer of delayed hypersensitivity to diphtheria toxin in man. *J Exp Med.* 1956;104:321-335. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2136574/>
4. Borkowsky W, Suleski P, Bhardwaj N, Lawrence HS. Antigen-specific activity of murine leukocyte dialysates containing transfer factor on human leukocytes in the leukocyte migration inhibition (LMI) assay. *J Immunol.* 1981;126(81):80-82.
5. Lawrence HS. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest.* 1955;34(2):219-230. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC438618/>
6. Kirkpatrick CH. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol Med.* 2000;6(4):332-341. Disponible en: <http://static.smallworldlabs.com/molmedcommunity/content/pdfstore/332.pdf>
7. Kirkpatrick CH, Hamad AR, Morton LC. Murine transfer factors: dose-response relationships and routes of administration. *Cell Immunol.* 1995;164(2):203-206.

8. Sánchez-González DJ, Sosa-Luna CA, Vásquez-Moctezuma I. Factores de transferencia en la terapéutica médica. *Med Clin.* 2011;137(6):273-277. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-articulo-factores-transferencia-terapeutica-medica-S0025775310005774>
9. García-Martín MC, Cruza-Cáceros M, Sánchez-Rodríguez A, Abdo-Rodríguez A. Factor de transferencia y extractos bacterianos en asmáticos con infecciones respiratorias a recurrentes. *Alergia Inmunol Pediatr.* 1998;17(4):124-127.
10. Gellin B, Modlin JF, Casadevall A, Pirofski LA. Adjunctive immune therapy for fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):1048-1056. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/33/7/1048.full>
11. Aguilar-Ríos JM, León-Burgos V, Baeza-Bacab MA. [Acute asthma prevalence in children and teenagers from Merida, Yucatan, Mexico]. *Rev Alerg Mex.* 2009;56(1):3-8.
12. Flores-Sandoval G, Gómez-Vera J, Orea-Solano M, López-Tiro J, Serrano E, Rodríguez A, Estrada-Parra S, Jiménez-Saab N [Transfer factor as specific immunomodulator in the treatment of moderate-severe atopic dermatitis]. *Rev Alerg Mex.* 2005;52(6):215-220.
13. Viza D, Fudenberg HH, Palareti A, Ablashi D, De Vinci C, Pizza G. Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biol (Praha).* 2013;59(2):53-67.
14. Li C, Huang L, Wang Y, Li X, Liang S, Zheng Y. Preparation and properties of the specific anti-influenza virus transfer factor. *Head Face Med.* 2010;6(10):22. doi: 10.1186/1746-160X-6-22
15. Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamaria V, Ondarza R, Chávez R, Correa B, Monges A, Cabezas R, Calva C, Estrada-García I. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. *Int. J. Immunopharmacol.* 1998;20(10):521-535.
16. Viza D. AIDS and transfer factor: myths, certainties and realities. *Biotherapy.* 1996;(1-3):17-26.
17. Russian Health Ministry. [Blog]. Ministry of Health and Social Development of Russian Federation. Transfer factor use in immunorehabilitation after infectious-inflammatory and somatic diseases. Methodological letter. Moscow, 2004. Disponible en: <http://russianhealthministry.blogspot.mx/2008/01/6-conclusion.html?m=0>
18. Goergescu C. Effect of long-term therapy with transfer factor in rheumatoid arthritis. *Med Interne.* 1985 23(2):135-140.
19. Lamoureux G, Cosgrove J, Duquette P, Lapierre Y, Jolicoeur R, Vanderland F. A clinical and immunological study of the effects of transfer factor on multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 1981;43(3):557-564. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1537193/>
20. Ojeda MO, van't Veer C, Fernández-Ortega CB, Araña-Rosainz MJ, Buurman WA. Dailyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNF-alpha, IL-6 & IL-8, in bacterial component-activate leukocytes and endothelial cells. *Inflamm Res.* 2005;54(2):74-81.
21. Wang RN, Wang YB, Geng JW, Guo DH, Liu F, Chen HY, Zhang HY, Cui BA, Wei ZY. Enhancing immune responses to inactivated porcine parvovirus oil emulsion vaccine by co-inoculating porcine transfer factor in mice. *Vaccine.* 2012;30(35):5246-5252. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.077
22. Viza D, Fudenberg HH, Palareti A, Ablashi D, De Vinci C, Pizza G. Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biol (Praha).* 2013;59(2):53-67. Disponible en: <http://fb.cuni.cz/volume-59-2013-no-2#articFB2013A0007>
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
25. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Undécima edición. México: Secretaría de Salud; 2014.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. Diario Oficial de la Federación 2012 Oct 26. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5275587&fecha=26/10/2012
27. Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios. Diario Oficial de la Federación 2012 Nov 21. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5278341&fecha=21/11/2012

28. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Diario Oficial de la Federación 2012 Oct 11. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Normas/050216nom059.pdf>
29. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Diario Oficial de la Federación 2010 Mar 1. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5133449&fecha=01/03/2010
30. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria. Diario Oficial de la Federación 2010 Abr 5. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5137518&fecha=05/04/2010