

SEMINARIO 2

TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Bioquímica y Biología Molecular 1

Grado en Medicina

Universidad de Málaga

Francisco M. Peinado

peinadofm@uma.es

ÍNDICE

1. Introducción.
 - Concepto de proteínas. ¿Por qué son importantes?
 - Principales funciones de las proteínas y ejemplos clínicos.
 - Estructura de las proteínas.
 - Relación estructura-función.
2. Purificación de proteínas: principios generales.
 - Selección de la fuente de proteínas.
 - Pasos iniciales:
 - o Homogeneización.
 - o Lisis celular (detergentes/métodos mecánicos).
 - o Centrifugación.
 - Precauciones tras la extracción de la proteína.
3. Métodos de separación por centrifugación.
 - Tipos de centrifugación
 - o Centrifugación convencional.
 - o Ultracentrifugación: preparativa vs analítica.
 - Estrategias de fraccionamiento
 - o Centrifugación diferencial.
 - o Centrifugación isopícnica.
4. Métodos de purificación según las características de las proteínas:
 - Solubilidad:
 - o Salting in.
 - o Salting out.
 - Carga iónica:
 - o Cromatografía de intercambio iónico.
 - o Electroforesis.
 - Polaridad:
 - o Cromatografía de adsorción.
 - o Cromatografía fase inversa.
 - o Cromatografía interacción hidrófoba.
 - Tamaño molecular:
 - o Diálisis y ultrafiltración.

- Electroforesis en gel (SDS-PAGE).
 - Cromatografía en filtración en gel (exclusión molecular).
 - Ultracentrifugación.
 - Especificidad de unión:
 - Cromatografía de afinidad.
5. Técnicas clave en la práctica biomédica.
- Diálisis.
 - Cromatografía en filtración en gel (exclusión molecular).
 - Cromatografía de intercambio iónico.
 - Cromatografía de afinidad.
 - Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
 - Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE).
 - Isoelectroenfoque.
 - Electroforesis bidimensional.
6. Problemas habituales durante la purificación.
- Bajo rendimiento.
 - Inactivación.
 - Agregación.
 - Proteólisis.
7. Evaluación de una purificación.
- Proteína total.
 - Actividad total.
 - Actividad específica.
 - Rendimiento.
 - Grado de purificación.
8. Determinación de la estructura primaria. Secuenciación de aminoácidos. Métodos clásicos.
- Degradación de Edman.
 - Fragmentación y ensamblaje de proteínas.
 - Estrategia química.
 - Estrategia enzimática.
9. Información que aporta la secuencia de Aas:
- Función.
 - Evolución.

- Destino celular.
 - Relevancia clínica.
10. Métodos de análisis estructural avanzado.
- Espectrometría de masas.
 - Cristalografía de rayos X.
 - Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial.
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico.
- Antígeno y anticuerpo:
 - Concepto, estructura y tipos.
 - Obtención de anticuerpos monoclonales (hibridomas) y policlonales.
 - Técnicas inmunológicas:
 - ELISA:
 - Indirecto.
 - Sandwich.
 - Western blot.
 - Reacción de comprobación tras la obtención de enzimas.
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares. Síntesis de péptidos.
14. Terapia génica.
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento.
16. Conclusiones.

Seminario 2. Técnicas para el estudio de proteínas.

1. Introducción:

Concepto de proteínas. ¿Por qué son importantes?

Las proteínas son biomoléculas orgánicas formadas por una o varias cadenas lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Constituyen, junto con los ácidos nucleicos, los principales ejecutores de la información genética. *El ADN guarda las instrucciones, pero son las proteínas las que “hacen el trabajo”.*

Su importancia radica en que desempeñan un papel crucial en prácticamente todos los procesos biológicos, cumpliendo una enorme variedad de funciones: catálisis, transducción de señales, soportes estructurales, defensa, movimiento, regulación, señalización... Errores en las proteínas (mutaciones, mal plegamiento, déficit enzimáticos) son responsables de la mayoría de enfermedades humanas.

Principales funciones de las proteínas y ejemplos clínicos (Tabla 1):

- **Catálisis:** las enzimas son proteínas que aceleran reacciones biológicas. Sin ellas, la vida sería inviable, porque las reacciones bioquímicas serían demasiado lentas para sostener un organismo.

Ejemplo clínico: en bioquímica clínica se miden actividades enzimáticas como alanina aminotransferasa (ALT) o la aspartato aminotransferasa (AST) para detectar daño hepático; la creatin-quinasa (CK) para evaluar lesión muscular; o la lipasa en patología pancreática.

- **Defensa:** los anticuerpos (inmunoglobulinas) son proteínas de defensa que reconocen antígenos y neutralizan patógenos.

Ejemplo clínico: las vacunas funcionan induciendo la producción de anticuerpos específicos frente a un agente infeccioso.

- **Transporte:** Algunas proteínas permiten trasladar moléculas vitales.

Ejemplo clínico: la hemoglobina transporta oxígeno en la sangre. En hemoglobinopatías como la anemia falciforme o las talasemias, esta función se ve alterada y los pacientes desarrollan anemia.

- **Soporte estructural:** determinadas proteínas forman fibras o entramados que aportan resistencia mecánica.

Ejemplo clínico: el colágeno es una proteína fibrosa que se encuentra en el hueso, piel, tendones y cartílago. Alteraciones en su síntesis producen enfermedades del tejido conectivo, entre las que se encuentran el síndrome de Ehlers-Danlos (hiperlaxitud articular, fragilidad de la piel) y la osteogénesis imperfecta (fragilidad ósea, huesos de cristal).

- **Movimiento:** las proteínas motoras permiten la contracción muscular y el transporte intracelular.

Ejemplo clínico: la miosina interactúa con la actina para producir contracción muscular; la dineína y la kinesina transportan orgánulos a lo largo de microtúbulos. Alteraciones en la distrofina (proteína de anclaje) causan distrofias musculares, como la de Duchenne, con debilidad progresiva por fallo en la contracción.

- **Regulación:** muchas proteínas actúan como reguladores de la expresión génica o de rutas metabólicas.

Ejemplo clínico: el factor de transcripción p53 controla la división celular y reparación del ADN. Su mutación permite proliferación descontrolada y favorece el cáncer.

- **Señalización:** numerosas hormonas son proteínas o péptidos que transmiten información entre células y tejidos.

Ejemplo clínico: la insulina, una hormona proteica producida por las células β pancreáticas, disminuye la glucemia al favorecer la captación de glucosa en tejidos. Su déficit (diabetes tipo 1) o resistencia a su acción (diabetes tipo 2) origina diabetes mellitus, una de las enfermedades crónicas más prevalentes.

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas y ejemplos clínicos.

Función	Descripción breve	Ejemplo clínico
Catálisis	Aceleran reacciones bioquímicas.	ALT/AST (hígado), CK (músculo), lipasa.
Defensa	Neutralizan patógenos.	Anticuerpos → base de las vacunas.
Transporte	Mueven moléculas vitales.	Hemoglobina (O ₂) → anemias, talasemias.
Soporte	Dan resistencia mecánica.	Colágeno → Ehlers-Danlos, osteogénesis imperfecta
Movimiento	Contracción y transporte intracelular.	Miosina-actina; distrofina → Duchenne.
Regulación	Controlan genes y metabolismo.	p53 → mutado en cáncer.
Señalización	Hormonas proteicas transmiten señales.	Insulina → diabetes tipo 1 y 2.

Estructura de las proteínas.

El funcionamiento de una proteína depende de cómo esté organizada su cadena de aminoácidos. Esa organización se describe en distintos niveles estructurales, cada uno con una importancia clave en la biología y la clínica.

Estructura primaria

Es simplemente la secuencia lineal de aminoácidos, unida por enlaces peptídicos. Pero esa secuencia, como veremos, ya determina gran parte de lo que vendrá después. Por ejemplo, en la anemia falciforme, un único cambio de aminoácido (ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena β de la hemoglobina) es suficiente para modificar las propiedades de la proteína y causar una enfermedad sistémica.

Estructura secundaria

Describe la organización local de la cadena polipeptídica. Los dos motivos principales son la hélice α, una espiral estabilizada por enlaces de hidrógeno, y la hoja β, donde las cadenas se disponen en láminas paralelas o antiparalelas, también estabilizadas por puentes de hidrógeno (**Figura 1**). Estos motivos estructurales aparecen repetidamente en proteínas muy diferentes, como módulos básicos de construcción.

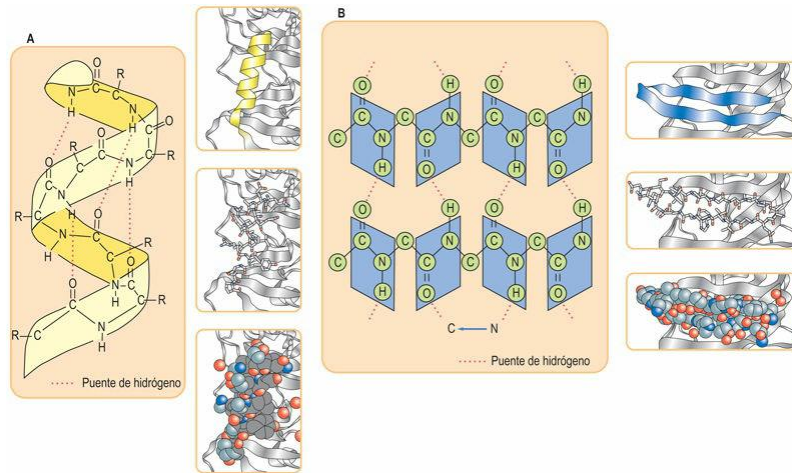


Figura 1. Motivos estructurales secundarios de las proteínas: hélices α y láminas β . Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica Médica. 4.ª ed. Elsevier; 2015.

Estructura terciaria

Corresponde al plegamiento tridimensional completo de una proteína, donde interactúan los radicales laterales de los aminoácidos mediante puentes disulfuro, interacciones hidrofóbicas o fuerzas electrostáticas. Este nivel es el que confiere a cada proteína su forma final y su función. Un fallo en el plegamiento puede inactivar la proteína o volverla dañina: en el Alzheimer, por ejemplo, la proteína β -amiloide adopta conformaciones anómalas que resultan tóxicas para las neuronas.

Estructura cuaternaria

Algunas proteínas funcionan como complejos de varias cadenas polipeptídicas. El ejemplo clásico es la hemoglobina, formada por cuatro cadenas (2 α y 2 β). Esta asociación permite la cooperatividad en la unión del oxígeno, mecanismo esencial para un transporte eficiente en la sangre.

La jerarquía estructural de las proteínas (primaria \rightarrow secundaria \rightarrow terciaria \rightarrow cuaternaria) (**Figura 2**) es el lenguaje molecular de la vida. Una mutación en la estructura primaria puede desencadenar una cascada de problemas en niveles superiores.

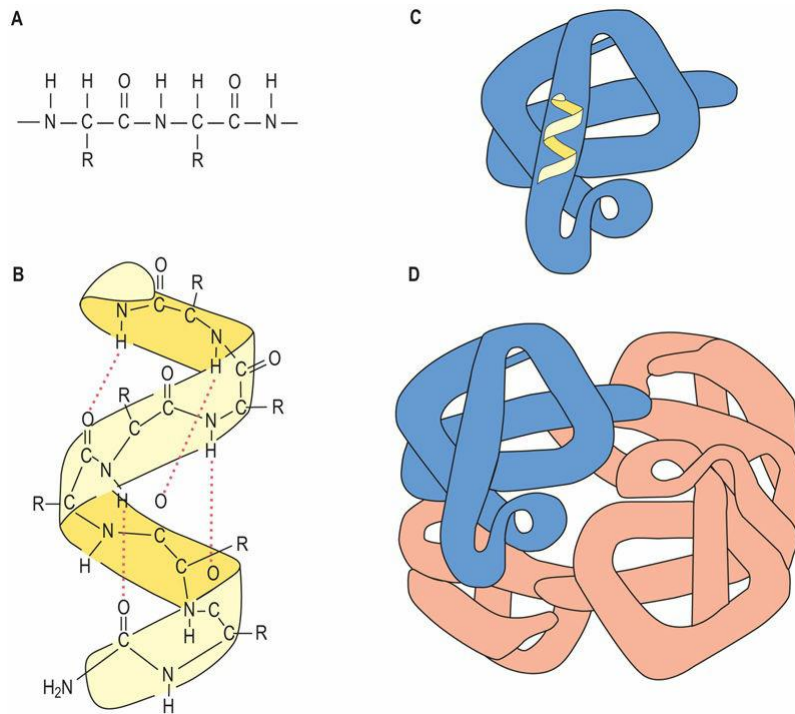


Figura 2. Niveles estructurales de las proteínas: primaria (A), secundaria (B), terciaria (C) y Cuaternaria (D). Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica Médica. 4.ª ed. Elsevier; 2015.

1.3 Relación estructura-función

Un principio clave que debemos tener siempre presente es que la estructura determina la función. La secuencia de aminoácidos (estructura primaria) condiciona el plegamiento posterior (estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria), y este plegamiento es lo que permite, o impide, una función específica.

Un ejemplo paradigmático es la anemia falciforme. En esta enfermedad, la sustitución de un único aminoácido, ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena β de la hemoglobina, altera las interacciones hidrofóbicas de la proteína. Como consecuencia, la hemoglobina mutante (HbS) se agrega en estado desoxigenado, deformando los hematíes en forma de hoz. Estos glóbulos rojos rígidos obstruyen capilares, originando crisis de dolor, anemia hemolítica y complicaciones sistémicas.

Algo similar ocurre en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, donde proteínas como la β -amiloide o la α -sinucleína sufren un mal plegamiento. Pierden su función normal y forman agregados tóxicos que dañan a las neuronas.

En definitiva: estructura distinta = función distinta. Así, mientras la hemoglobina, globular, está adaptada al transporte de oxígeno, el colágeno, con su estructura de triple

hélice, aporta resistencia mecánica a tendones y huesos. Cada proteína está diseñada para una función concreta; el colágeno nunca podría transportar oxígeno, ni la hemoglobina sostener un tendón.

Las proteínas son, por tanto, la base de la vida y de la medicina. Comprenderlas exige estudiar su estructura y su función de manera conjunta. De ahí que todas las técnicas que veremos a partir de ahora tengan un mismo propósito: conocer la estructura de las proteínas para entender su función, lo que a su vez nos permite diagnosticar enfermedades, comprender su origen y diseñar nuevas terapias.

2. Purificación de proteínas: principios generales.

Para comprender la estructura y la función de una proteína necesitamos estudiarla de manera individual. El primer paso, por tanto, es separarla del resto de proteínas y de componentes celulares: lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y centenares de proteínas distintas que conviven en la célula. Este proceso se denomina purificación de proteínas, y su objetivo es obtener la proteína de interés en condiciones suficientemente puras para ser analizada.

Selección de la fuente de proteínas

Antes de comenzar, debemos decidir de dónde obtendremos nuestra proteína. Las fuentes más habituales son:

- **Suero sanguíneo**
 - o Contiene proteínas abundantes como albúmina, inmunoglobulinas o factores de coagulación.
 - o Ejemplo: la albúmina sérica puede purificarse y emplearse como estándar en el laboratorio o como tratamiento clínico en soluciones intravenosas.
- **Tejidos u órganos**
 - o Permiten aislar proteínas con funciones locales específicas.
 - o Ejemplo: la mioglobina del músculo o enzimas hepáticas usadas en estudios metabólicos.
- **Microorganismos o células recombinantes**
 - o Hoy en día son la fuente principal en biomedicina y farmacia.
 - o Consisten en insertar genes humanos en bacterias (como *E. coli*) o levaduras, que producen la proteína humana a gran escala.

- Ejemplo: la insulina recombinante, piedra angular del tratamiento de la diabetes.

Pasos iniciales.

Cuando ya hemos decidido qué proteína queremos estudiar y de qué fuente la vamos a obtener (sangre, tejido, bacterias recombinantes...), el siguiente paso es sacarla de ese entorno complejo. Para ello seguimos unos pasos iniciales comunes que preparan la muestra antes de aplicar técnicas más específicas:

- Homogeneización: consiste en romper el tejido de partida para liberar las células que contienen la proteína. Por ejemplo, para estudiar una proteína muscular como la mioglobina, no podemos trabajar con el músculo entero. Primero tenemos que triturar o disgregar ese tejido hasta convertirlo en una suspensión celular. La homogeneización puede hacerse con:
 - Morteros u homogeneizadores mecánicos.
 - Trituración en presencia de disoluciones tampón.
 - Métodos más modernos como homogeneizadores a presión.
- Lisis celular: consiste en romper las células presentes en la suspensión obtenida anteriormente para liberar su contenido. Para ello, existe diferentes métodos:
 - Métodos químicos: Uso de detergentes (ej: Triton X-100, SDS en otras aplicaciones) que rompen las membranas lipídicas. Estos detergentes solubilizan las proteínas de membrana y permiten que el contenido celular quede libre en la solución. Válido para células sin pared celular como las células de tejidos animales, pero no es suficiente para células vegetales o bacterias.
 - Métodos físicos o mecánicos:
 - Sonicación: aplicar ultrasonidos que rompen las membranas.
 - Ciclos de congelación/descongelación: al congelar y descongelar, se forman cristales de hielo que rompen la membrana.
 - Presión mecánica: pasar la suspensión por dispositivos que rompen las células por presión (prensa de French).

Cada método tiene sus ventajas e inconvenientes: los detergentes pueden desnaturalizar algunas proteínas, mientras que la sonicación puede generar calor y dañar la muestra si no se controla. Por eso siempre se ajusta el protocolo según

la proteína de interés. Volviendo al ejemplo de la hemoglobina, si queremos estudiarla a partir de eritrocitos, primero se homogeneiza la sangre (rompiendo los hematíes) y posteriormente se aplica una lisis osmótica: se colocan los hematíes en un medio hipotónico, el agua entra, la célula se hincha y explota y la hemoglobina queda libre en la solución. Este es un ejemplo muy sencillo, pero refleja el principio general: romper barreras celulares para liberar la proteína de interés.

- Centrifugación: el homogenado y lisado obtenido de la homogeneización y lisis, que contiene una mezcla de proteínas, membranas y restos celulares, se somete a filtración y/o centrifugación para obtener el sobrenadante y así poder separar y enriquecer las proteínas para obtenerlas en condiciones de pureza suficiente.

Precauciones tras la extracción de proteínas

Una vez hemos conseguido liberar las proteínas de las células, aparece un problema nuevo: las proteínas son frágiles. Fuera de su entorno natural, muchas tienden a desnaturalizarse, degradarse o perder actividad. Por ello, hay que tomar diversas precauciones en el laboratorio:

- Mantener bajas temperaturas ($\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$): el frío ralentiza las reacciones químicas y enzimáticas que podrían degradar la proteína. Por ello, todos estos procedimientos se hacen en cámaras frías, con tubos y rotores refrigerados.
- Uso de inhibidores de proteasas: al romper la célula liberamos también proteasas (enzimas que degradan proteínas). Si no las bloqueamos, esas proteasas “se comen” a nuestra proteína de interés. Por eso se añaden cócteles de inhibidores (ej: PMSF, leupeptina).
- pH controlado mediante tampones: cada proteína tiene un rango de pH en el que es estable. Cambios bruscos de pH pueden desnaturalizarla. Se utilizan soluciones tampón (ej: fosfatos, Tris-HCl) que mantienen el pH constante durante la manipulación.

Estas precauciones explican por qué en bioquímica clínica muchas muestras deben conservarse en frío o con aditivos. Por ejemplo, en los laboratorios hospitalarios, las muestras de sangre se mantienen refrigeradas y con anticoagulantes o estabilizadores para preservar proteínas y enzimas hasta su análisis.

Con estos pasos iniciales (homogeneización y lisis) obtenemos un lisado u homogenado que contiene una mezcla de proteínas, membranas y restos celulares. Esta preparación se somete a filtración y/o centrifugación para obtener el sobrenadante y así poder separar y enriquecer las proteínas para obtenerlas en condiciones de pureza suficiente.

2. Métodos de separación por centrifugación:

Tipos de centrifugación:

- **Centrifugación convencional:** una de las primeras herramientas que se utilizan para separar componentes celulares y proteínas es la centrifugación. Tras aplicar una fuerza centrífuga, las partículas se separan de otras moléculas según su tamaño y densidad (separa componentes grandes). Esto nos permite ir fraccionando poco a poco el contenido celular y, en algunos casos, estudiar propiedades de las moléculas en detalle.
- **Ultracentrifugación:** la ultracentrifugación aplica fuerzas centrífugas extremadamente altas y es fundamental tanto para preparar muestras como para estudiar propiedades moleculares, ya que separa partículas pequeñas según masa, densidad y hasta forma, con mayor resolución. Existen dos modalidades principales:
 - Ultracentrifugación preparativa: sirve para separar componentes celulares o bien obtener precipitados de biomoléculas para su posterior uso. Ejemplo: separación de lipoproteínas plasmáticas para estudiar el metabolismo del colesterol. Se pueden obtener fracciones enriquecidas en LDL o HDL.
 - Ultracentrifugación analítica: además de separar, se analizan las propias biomoléculas, se estudian sus propiedades hidrodinámicas (masa, forma, densidad). En este caso utilizamos el coeficiente de sedimentación, expresado en unidades Svedberg (S), que refleja la velocidad con la que una partícula se desplaza en el campo centrífugo. Ejemplo: caracterización de lipoproteínas plasmáticas. Con esta técnica se describieron las diferencias de densidad entre LDL y HDL, que hoy son fundamentales en el estudio del riesgo cardiovascular.

- Cuanto menor sea el valor de S, la molécula se moverá más lentamente por la fuerza centrífuga, y cuanto mayor es el valor de S, más rápido sedimenta.
- En la **Tabla 2** vemos ejemplos de proteínas con su peso molecular y su coeficiente de sedimentación. Podemos observar, por ejemplo, como el inhibidor de la tripsina pancreática tienen un peso molecular pequeño y un coeficiente de sedimentación pequeño (S=1). Por tanto, sedimenta muy lentamente. Por otra parte, la lactato deshidrogenasa es mucho más grande (146 KDa), tiene un coeficiente de sedimentación mayor (7.54) y, por tanto, sedimenta más rápido.

Tabla 2. Ejemplos de proteínas con sus valores de sedimentación (S) y peso molecular.

Protein	S value (Svedberg units)	Molecular weight
Pancreatic trypsin inhibitor	1	6,520
Cytochrome <i>c</i>	1.83	12,310
Ribonuclease A	1.78	13,690
Myoglobin	1.97	17,800
Trypsin	2.5	23,200
Carbonic anhydrase	3.23	28,800
Concanavlin A	3.8	51,260
Malate dehydrogenase	5.76	74,900
Lactate dehydrogenase	7.54	146,200

From T. Creighton, *Proteins*, 2nd Edition (W. H. Freeman and Company, 1993), Table 7.1.

En la **Figura 3** se representan distintos componentes biológicos según dos parámetros clave:

- Eje X (horizontal): coeficiente de sedimentación (S): refleja la velocidad con la que una partícula sedimenta en el campo centrífugo. Cuanto mayor es el valor de S, más rápidamente se mueve.
- Eje Y (vertical): densidad (g/cm³): indica el punto de equilibrio en gradientes de densidad; cada molécula o partícula se “detiene” en la capa cuya densidad coincide con la suya.

De este modo, el gráfico nos muestra dónde “caen” distintas partículas biológicas:

- Las proteínas solubles tienen baja densidad y valores pequeños de S.

- El RNA y el DNA presentan densidades más altas, lo que permite separarlos claramente.
- Virus y microsomas sedimentan en rangos intermedios.
- Complejos más grandes como ribosomas y polisomas, cloroplastos, mitocondrias o incluso los núcleos celulares aparecen en la zona de mayor coeficiente S, porque son partículas voluminosas y pesadas.

Este “mapa” refleja que la ultracentrifugación es lo bastante precisa como para separar desde enzimas individuales hasta orgánulos completos, lo que la convierte en una técnica fundamental tanto en investigación básica como en aplicaciones biomédicas (por ejemplo, en el aislamiento de mitocondrias para estudiar enfermedades metabólicas, o de lipoproteínas para evaluar riesgo cardiovascular).

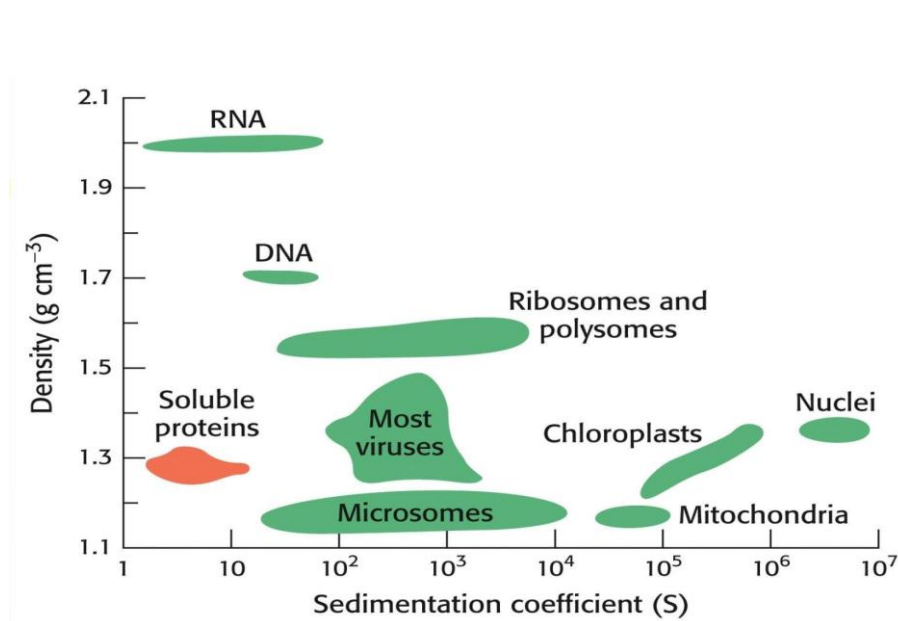


Figura 3. Separación de proteínas, ácidos nucleicos y orgánulos según coeficiente de sedimentación y densidad. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Estrategias de fraccionamiento:

En la centrifugación se pueden utilizar distintas estrategias para el fraccionamiento de la muestra, entre las que se encuentran la centrifugación diferencial, la zonal y la isopícnica.

- **Centrifugación diferencial:** consiste en someter una muestra a centrifugaciones sucesivas con velocidades crecientes. Se puede llevar a cabo tanto en la centrifugación convencional como en la ultracentrifugación. En cada paso, sedimentan primero las partículas más grandes y densas, y posteriormente las más pequeñas y ligeras. Cada orgánulo celular tiene un tamaño y densidad característicos, por lo que va sedimentando en un momento distinto del proceso. Así conseguimos fracciones enriquecidas en: núcleos, mitocondrias, microsomas, citosol.

Un ejemplo clínico lo tenemos en los estudios de enfermedades mitocondriales. La centrifugación diferencial permite aislar fracciones mitocondriales y analizar su actividad enzimática (ej: complejos de la cadena respiratoria).

Los pasos típicos son (**Figura 4**):

- Primera centrifugación (500g, 10 min): se sedimentan los núcleos y se obtiene un pellet nuclear que contiene ADN y proteínas nucleares.
- Segunda centrifugación (10000g, 20 min): se sedimentan las mitocondrias y se obtiene un pellet mitocondrial, útil para estudiar procesos como la respiración celular.
- Tercera centrifugación (100000g, 1h): se sedimentan los microsomas (fragmentos de retículo endoplasmático y vesículas) y ribosomas.
- Sobrenadante final: contiene las proteínas solubles del citosol.

La centrifugación diferencial es sencilla, barata y tremendamente útil: nos permite transformar una sopa celular en fracciones ordenadas de orgánulos. Es el primer paso en muchísimos estudios clínicos, desde metabolismo mitocondrial hasta toxicidad hepática.

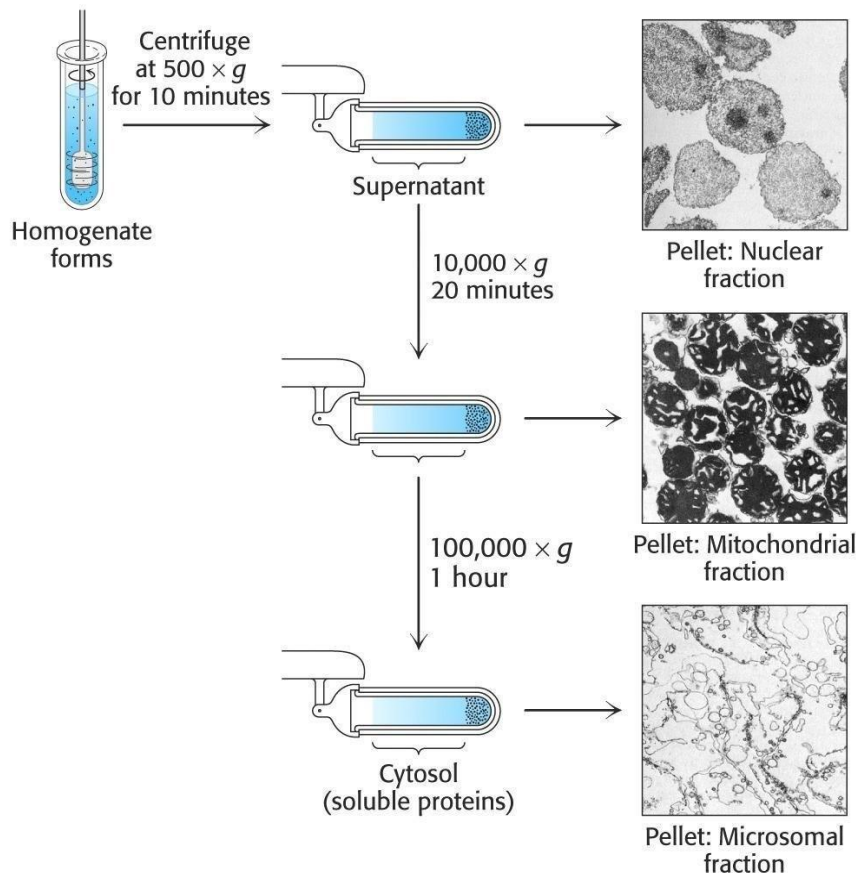


Figura 4. Pasos de la centrifugación diferencial. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

- **Centrifugación isopícnica (gradiente de densidad) (Figura 5):** es una técnica que se basa en el uso de un gradiente de densidad (sacarosa o cloruro de cesio). Solo se puede llevar a cabo mediante ultracentrifugación ya que necesita fuerzas centrífugas muy altas que no son alcanzables mediante la centrifugación convencional. La muestra se mezcla con la solución de gradiente (ej. cloruro de cesio para ADN o sacarosa para lipoproteínas). Bajo ultracentrifugación, cada partícula migra hasta la posición donde su densidad es exactamente igual a la del medio. No depende del tiempo de centrifugación: una vez alcanzado el equilibrio, las partículas quedan “flotando” en su posición isodensa. De este modo, las proteínas, orgánulos o complejos macromoleculares se ordenan en “bandas” bien definidas dentro del tubo, cada una representando un grupo de moléculas con la misma densidad.

Finalmente, para recuperarlas, se perfora el fondo del tubo y se van recogiendo fracciones de abajo hacia arriba. Así obtenemos diferentes fracciones enriquecidas en los distintos componentes de la mezcla original, lo que permite analizarlos o purificarlos de manera muy precisa.

Este método fue clave para diferenciar el colesterol LDL (“malo”) del HDL (“bueno”): aunque ambos son lipoproteínas, su densidad distinta permite separarlos y estudiarlos, lo que resultó fundamental para comprender su papel en el riesgo cardiovascular.

- **Centrifugación zonal (gradiente de tasa de sedimentación):** es una técnica que separa partículas en un gradiente según su *tasa de sedimentación*, es decir, por su tamaño y masa. La muestra se coloca encima de un gradiente de densidad preformado (por ejemplo, de sacarosa). Este gradiente evita turbulencias y mezcla durante la centrifugación, manteniendo la separación ordenada. Aquí las partículas no migran hasta un equilibrio de densidad como en la isopícnica, sino que se separan en función de su velocidad de sedimentación, que depende de su tamaño y masa, siempre que tengan densidad mayor que la del medio. Para ello se prepara un tubo con un gradiente de sacarosa que aumenta progresivamente en densidad de arriba abajo. Luego, se coloca la muestra en la parte superior y durante la centrifugación, las partículas grandes y pesadas sedimentan más rápido y avanzan más por el gradiente. Las más pequeñas y ligeras se mueven más despacio y quedan en posiciones más altas. Se generan zonas o bandas bien definidas, cada una enriquecida en partículas de distinto tamaño/masa. Una aplicación de esta técnica sería la separación de virus de diferentes tamaños o de orgánulos celulares con masas distintas.

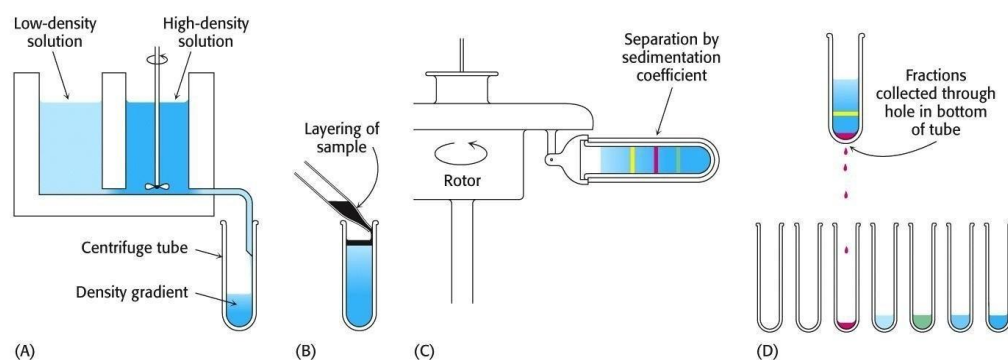


Figura 5. Esquema de centrifugación zonal (por tasa de sedimentación). Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

4. Métodos de purificación según las características de las proteínas.

La centrifugación permite separar componentes grandes y gruesos: núcleos, mitocondrias, ribosomas, membranas, citosol soluble. Es una purificación “bruta” a niveles de orgánulos o grandes complejos. El resultado es un extracto enriquecido en la proteína de interés, pero aún mezclado con muchas otras proteínas.

Por tanto, ¿cómo se podría separar la proteína de interés del resto de proteínas? Existen diferentes métodos de purificación según las características de la proteína. Los métodos de separación de proteínas aprovechan propiedades que varían de una proteína a otra (**Tabla 3**), entre las que se incluyen la solubilidad, tamaño, carga, afinidad específica de unión y polaridad. Cada una de estas características nos da acceso a una técnica de purificación distinta.

Tabla 3. Métodos de purificación de proteínas según sus propiedades físico-químicas.

Características	Procedimiento
Solubilidad	1. Salting in 2. Salting out
Carga iónica	1. Cromatografía de intercambio iónico 2. Electroforesis
Polaridad	1. Cromatografía de adsorción 2. Cromatografía en papel 3. Cromatografía fase inversa 4. Cromatografía interacción hidrófoba
Tamaño molecular	1. Dialisis y ultrafiltración 2. Electroforesis en gel 3. Cromatografía en filtración en gel 4. Ultracentrifugación
Especificidad de unión	1. Cromatografía de afinidad

- **Solubilidad:** puede modificarse mediante la adición de sales:
 - o A bajas concentraciones de sal, la solubilidad aumenta (*salting in*).
 - o A altas concentraciones, la solubilidad disminuye y la proteína precipita (*salting out*).

Un método muy empleado es la precipitación con sulfato de amonio, una sal muy soluble que permite fraccionar proteínas: algunas precipitan a concentraciones concretas, mientras que otras permanecen disueltas.

Ejemplo clínico: el aislamiento de inmunoglobulinas del suero sanguíneo puede realizarse con precipitación por sulfato de amonio

- **Carga iónica:** las proteínas tienen diferentes cargas eléctricas según su punto isoeléctrico y el pH del medio. Esta propiedad se aprovecha en dos técnicas fundamentales:
 - Cromatografía de intercambio iónico: separa proteínas en función de la carga, usando resinas cargadas positiva o negativamente que retienen a las proteínas con carga opuesta.
 - Electroforesis: separa proteínas aplicando un campo eléctrico; las proteínas migran a diferente velocidad según su carga y tamaño. Ejemplo clínico: la electroforesis de proteínas séricas permite detectar alteraciones como el pico monoclonal de las gammopatías (mieloma múltiple).
- **Polaridad:** la diferente afinidad de las proteínas por fases polares o apolares permite su separación.
 - Cromatografía de adsorción o en papel: se basa en la distinta interacción con una fase sólida polar.
 - Cromatografía en fase inversa: emplea una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar, separando según la hidrofobicidad.
 - Cromatografía de interacción hidrófoba: las proteínas con regiones hidrofóbicas interactúan con matrices apolares en condiciones de alta salinidad.

Ejemplo clínico: la purificación de hormonas peptídicas se suele realizar mediante cromatografía de fase inversa.

- **Tamaño molecular:** las proteínas también se diferencian por su masa y volumen.
 - Diálisis y ultrafiltración: separan proteínas de pequeñas moléculas a través de membranas semipermeables.
 - Electroforesis en gel (SDS-PAGE): separa en función del tamaño molecular, ya que el SDS les da carga negativa uniforme.

- Cromatografía de filtración en gel (exclusión molecular): las proteínas pequeñas entran en los poros del gel y avanzan más despacio, mientras que las grandes salen antes.
- Ultracentrifugación: permite separar proteínas o complejos macromoleculares según su coeficiente de sedimentación.

Ejemplo clínico: la cromatografía de exclusión molecular se usa para estimar el peso molecular de proteínas plasmáticas.

- **Especificidad de unión:** aprovecha la afinidad natural de una proteína por un ligando específico.
 - Cromatografía de afinidad: inmoviliza un ligando (anticuerpo, sustrato, inhibidor...) en una matriz, de modo que la proteína de interés queda retenida y luego se eluye selectivamente.

Ejemplo clínico: la purificación de anticuerpos monoclonales usando columnas con proteína A/G inmovilizada.

Cada proteína tiene propiedades únicas, y esas propiedades son las que utilizamos para diseñar la estrategia de purificación. El secreto no es aplicar todas las técnicas, sino elegir la que explota mejor la característica de la proteína que nos interesa.

5. Técnicas clave en la práctica biomédica

Diálisis

La diálisis (**Figura 6**) es un método para separar proteínas de moléculas pequeñas (como sales, azúcares o metabolitos) usando una membrana semipermeable, la cual permite el paso de moléculas pequeñas (sales, azúcares o metabolitos), pero retiene moléculas grandes como las proteínas.

La diálisis se realiza añadiendo la disolución de proteína y sal a un tubo de membrana semipermeable (normalmente una membrana de nitrocelulosa o colodión). Cuando el tubo se sumerge en una disolución tamponada diluida, las moléculas pequeñas pasarán a través de la membrana, pero las moléculas proteicas grandes quedarán retenidas en el tubo, dependiendo del tamaño del poro de la membrana de diálisis. Así, tras varias horas o incluso cambios sucesivos del tampón, la muestra queda “limpia” de sales y otras moléculas pequeñas, permitiendo trabajar con proteínas en condiciones más puras. En esencia, es un método simple pero crucial para preparar las muestras proteicas.

En la práctica biomédica, la diálisis es la base del procedimiento que se aplica también en medicina para pacientes con insuficiencia renal: se eliminan toxinas y sales del plasma sanguíneo mediante membranas semipermeables, aunque en un sistema mucho más complejo y adaptado al entorno médico.

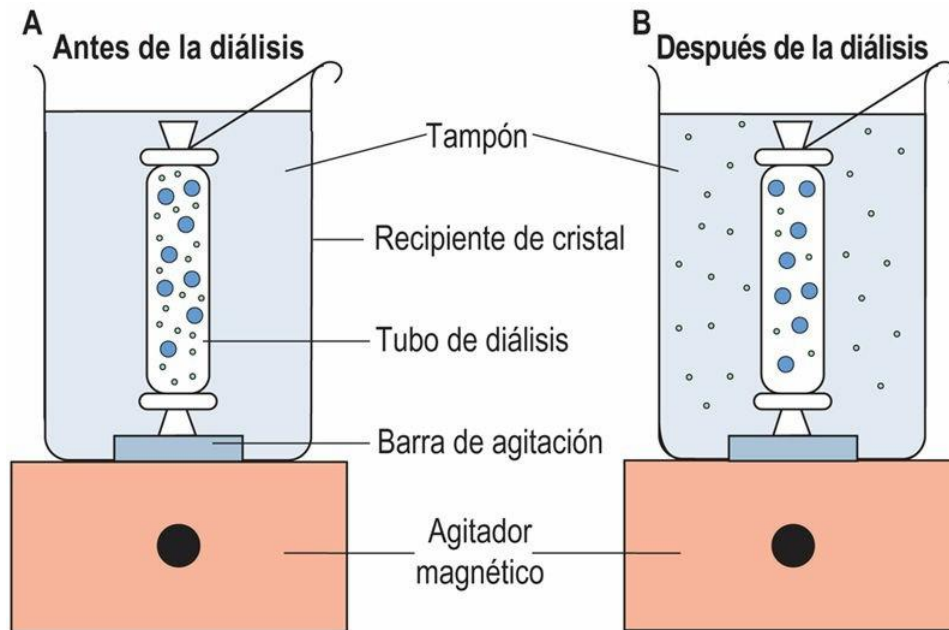


Figura 6. Principio de la diálisis: separación de proteínas y moléculas pequeñas mediante membrana semipermeable. Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica Médica. 4.ª ed. Elsevier; 2015.

Las proteínas y los compuestos de masa molecular baja son separados por diálisis según su tamaño. (A) Una disolución de proteínas con sales se coloca en un tubo de diálisis en un recipiente y se dializa agitándola en un tampón apropiado. (B) La proteína queda retenida en el tubo de diálisis, mientras que las sales se intercambiarán a través de la membrana. Si se utiliza un gran volumen de tampón externo y se va reemplazando ocasionalmente el tampón, la proteína también será intercambiada hacia la solución amortiguadora externa.

La diálisis no separa proteínas entre sí, pero es una herramienta básica para limpiarlas de contaminantes pequeños. Es un paso sencillo pero imprescindible antes de aplicar métodos más avanzados.

Cromatografía de filtración en gel (exclusión molecular)

La cromatografía de filtración en gel (**Figura 7**), también llamada cromatografía de exclusión molecular, es una técnica que separa las proteínas y otras biomoléculas en función de su tamaño.

La columna está rellena de unas bolitas llamadas perlas de polímeros de carbohidrato, que tienen poros de un tamaño determinado. Cuando introducimos una mezcla de

proteínas, las moléculas pequeñas pueden entrar en los poros y, por tanto, se “entretienen” más en su recorrido a lo largo de la columna. En cambio, las moléculas grandes no pueden entrar en los poros y avanzan más rápidamente, saliendo antes por la parte inferior de la columna.

De esta manera, el proceso permite separar moléculas según su tamaño relativo: primero se recogen las más grandes y después las más pequeñas.

Es un método muy utilizado no solo para purificar proteínas, sino también para estimar el peso molecular de una proteína desconocida, comparándola con proteínas de referencia.

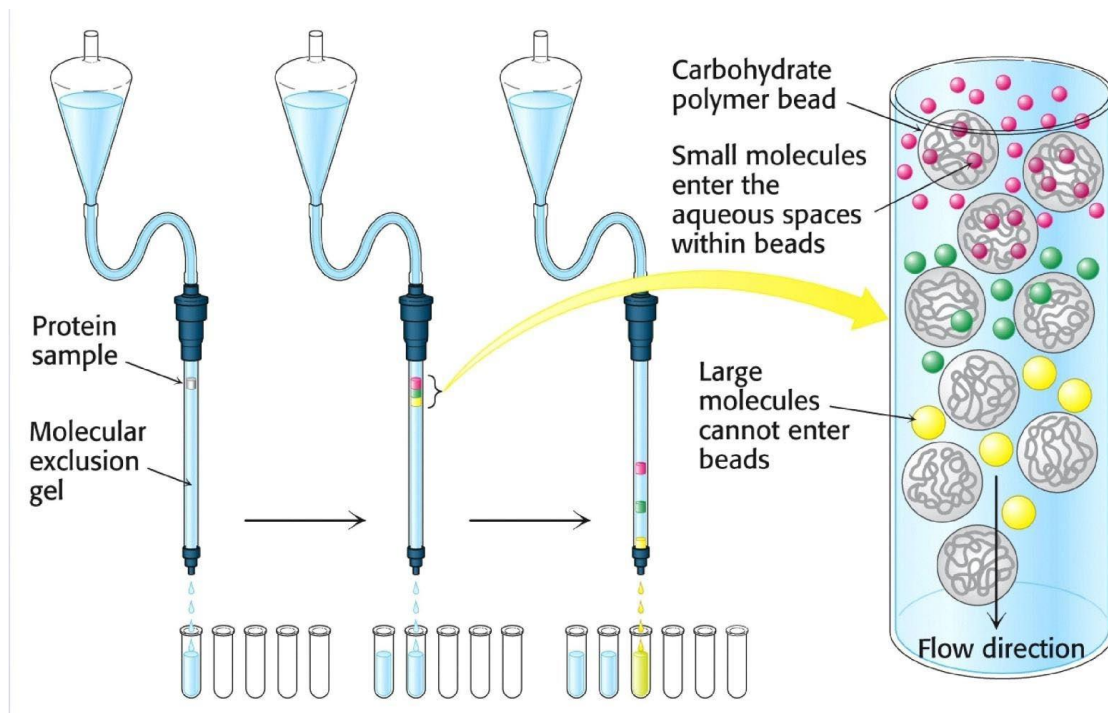


Figura 7. Cromatografía de filtración en gel. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

La muestra de proteínas se aplica en la parte superior de la columna y se separa según el tamaño: las moléculas grandes (amarillo) no entran en los poros y eluyen primero, mientras que las más pequeñas (verde, rosa) se retrasan al penetrar en ellos y eluyen después. Las fracciones se recogen en tubos separados. Ejemplo clínico: permite analizar inmunoglobulinas séricas y diferenciar monómeros (IgG), dímeros (IgA) y pentámeros (IgM).

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica que separa proteínas en función de su carga eléctrica (**Figura 8**).

La columna está rellena de pequeñas perlas (matriz) que llevan grupos cargados, los cuales pueden ser negativos (como los grupos carboximetilo, CM) o positivos (como los grupos dietilaminoetilo, DEAE). Cuando introducimos una mezcla de proteínas, las que tienen carga opuesta a la de la matriz se unirán fuertemente, mientras que las que tienen la misma carga pasarán sin retenerse.

Por ejemplo, si la columna está cargada negativamente, las proteínas cargadas positivamente quedarán atrapadas, mientras que las cargadas negativamente pasarán libremente.

Después, para liberar las proteínas unidas, se cambia el pH o la fuerza iónica (añadiendo sal). Esto rompe las interacciones y permite que las proteínas vayan saliendo poco a poco, cada una en función de lo fuerte que estaba unida.

De este modo, la técnica actúa como un “filtro eléctrico”, separando proteínas con pequeñas diferencias en su carga superficial.

Ejemplo clínico: la purificación de hemoglobina y sus variantes patológicas (como en la anemia falciforme o las talasemias) puede realizarse con este método, ya que las mutaciones alteran la carga de la proteína y, por tanto, su interacción con la matriz. Otro ejemplo clínico es la purificación de anticuerpos terapéuticos, donde se usan columnas de intercambio iónico para eliminar impurezas y obtener un producto puro y seguro para su uso en pacientes.

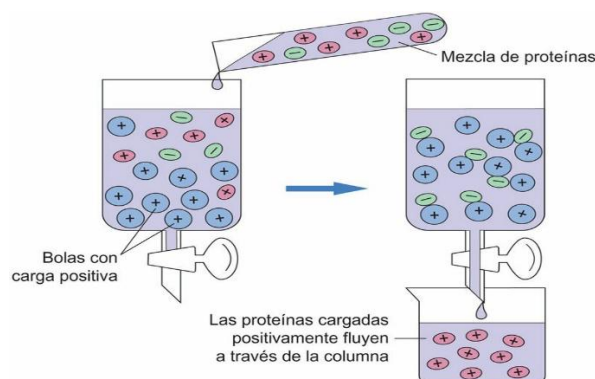


Figura 8. Cromatografía de intercambio iónico. Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica Médica. 4.^a ed. Elsevier; 2015.

Las mezclas de proteínas pueden separarse mediante cromatografía de intercambio iónico según sus cargas netas. Las bolas que tienen enlazados grupos con carga positiva se denominan intercambiadores de aniones, mientras que las que tienen grupos con carga negativa son intercambiadores de cationes. Esta figura muestra una columna de intercambio de aniones. Las proteínas cargadas negativamente se unen a las bolas cargadas positivamente y las proteínas cargadas positivamente fluyen a través de la columna.

Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una de las técnicas más específicas para separar proteínas. Se basa en una interacción altamente selectiva entre una proteína (el analito) y un ligando inmovilizado en la matriz de la columna (**Figura 9**).

Primero, la muestra se introduce en la columna, y únicamente las proteínas con afinidad por el ligando quedarán retenidas, mientras que el resto de moléculas se eliminan en la fase de lavado. Después, al añadir un agente competidor (como la propia molécula que reconoce la proteína, por ejemplo glucosa para proteínas que se unen a glucosa), la proteína de interés se libera y se recoge en forma purificada.

Ejemplo clínico: la cromatografía de afinidad se emplea en la purificación de anticuerpos monoclonales, fundamentales para terapias contra el cáncer, enfermedades autoinmunes o infecciones. También se usa en la purificación de proteínas recombinantes con “etiquetas de afinidad” (como la etiqueta His-tag), que permiten obtener proteínas terapéuticas de gran pureza, por ejemplo, la insulina recombinante utilizada en el tratamiento de la diabetes.

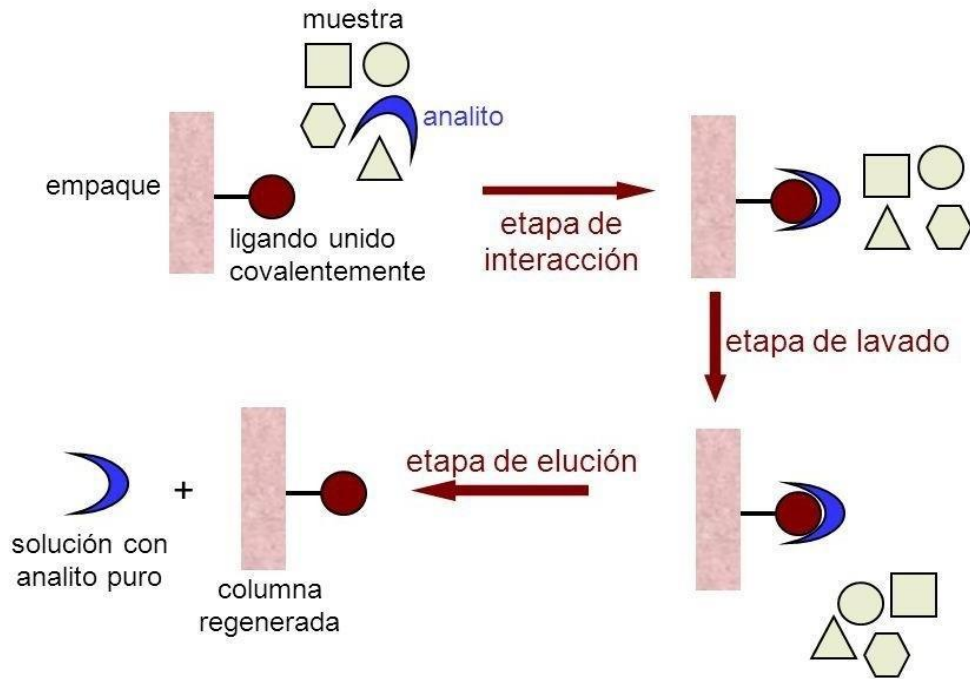


Figura 9. Principio de la cromatografía de afinidad: interacción, lavado y elución. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica muy potente que permite separar, identificar y cuantificar moléculas en una mezcla compleja con gran rapidez y precisión. Funciona haciendo pasar la muestra a través de una columna rellena de partículas muy finas bajo alta presión, lo que permite una interacción más eficiente entre la fase móvil (líquido que arrastra la muestra) y la fase estacionaria (el material de la columna).

Gracias a ello, se consigue una alta resolución y una separación muy rápida de los componentes, que se detectan a la salida de la columna y aparecen representados como picos en un cromatograma. Cada pico corresponde a una molécula diferente.

Ejemplo clínico: el HPLC se utiliza en hospitales y laboratorios para medir niveles de fármacos en sangre (monitorización terapéutica), detectar marcadores metabólicos en enfermedades hereditarias (como fenilcetonuria) o analizar hemoglobinas anómalas en pacientes con hemoglobinopatías. El HPLC es hoy una herramienta imprescindible en biomedicina. Nos permite pasar de una mezcla compleja a identificar con precisión proteínas, hormonas o fármacos en cuestión de minutos. Sin HPLC, no sería posible el

diagnóstico moderno de muchas enfermedades ni el control de tratamientos personalizados.

Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (**Figuras 10 y 11**) es una técnica de separación de proteínas basada en su tamaño molecular. Para ello, las proteínas se desnaturalizan y cargan negativamente con el detergente SDS, lo que asegura que todas migren hacia el polo positivo del campo eléctrico. El gel de poliacrilamida actúa como una matriz porosa que frena diferencialmente a las proteínas: las más pequeñas atraviesan más fácilmente y migran más rápido, mientras que las grandes se desplazan más lentamente. De este modo, se obtienen bandas bien definidas que permiten analizar la pureza, estimar el peso molecular y comparar distintas muestras proteicas.

1) ¿De qué está hecho el “camino” por el que correrán las proteínas?

El gel de poliacrilamida se forma mezclando acrilamida y bis-acrilamida. Se añaden un iniciador (persulfato amónico) y un catalizador (TEMED) para que polimericen y se forme una red con poros de tamaño controlable: a más % de acrilamida, poros más pequeños y, por tanto, mejor separación de proteínas pequeñas (pero peor para las grandes). El resultado es una placa transparente y firme que servirá de “pista de carreras”. El % de acrilamida decide qué rango de tamaños separas.

2) ¿Cómo preparamos a las proteínas para que compitan “solo por tamaño”?

Antes de cargar la muestra, “uniformizamos” a todas las proteínas para que no “gane” la que tenga más carga o forma más aerodinámica. Para eso usamos SDS (dodecil sulfato sódico), un detergente aniónico que:

- Se pega a la cadena peptídica (aprox. 1 SDS/2 aa),
- Desnaturaliza (rompe interacciones no covalentes) y linealiza la proteína,
- Les da carga negativa proporcional a su longitud.

Si además queremos que desaparezcan los efectos de puentes disulfuro, añadimos un agente reductor (β -mercaptoetanol o DTT). Así, todas las moléculas quedan como hilos cargados negativamente: competirán solo por tamaño.

3) ¿Cómo es la carrera?

Colocamos el gel en la cubeta, llenamos con tampón (Tris-Glicina u otro sistema), cargamos los pocillos: primero un marcador de pesos (ladder) y luego nuestras muestras tratadas con SDS (y reductor). Al aplicar campo eléctrico, todas las proteínas van hacia el ánodo (+) porque el SDS las ha vuelto aniónicas. La matriz porosa frena más a las grandes (se enredan antes) y deja pasar mejor a las pequeñas, de modo que, con el tiempo, se forma un patrón de bandas por tamaño. Al terminar, teñimos (Coomassie o plata) para visualizar las bandas y comparamos con el marcador.

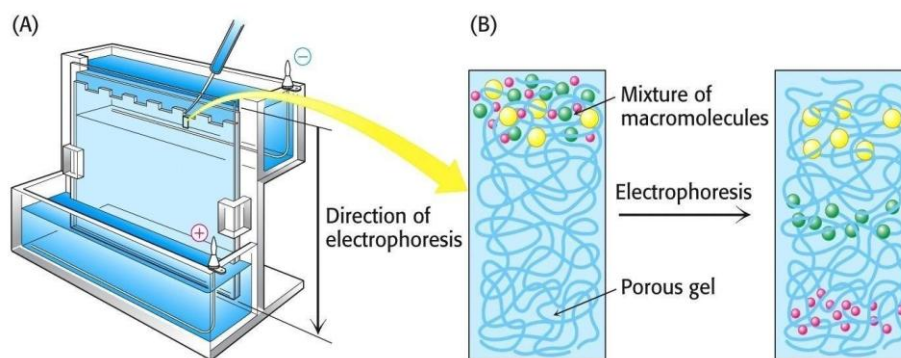


Figura 10. Principio de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

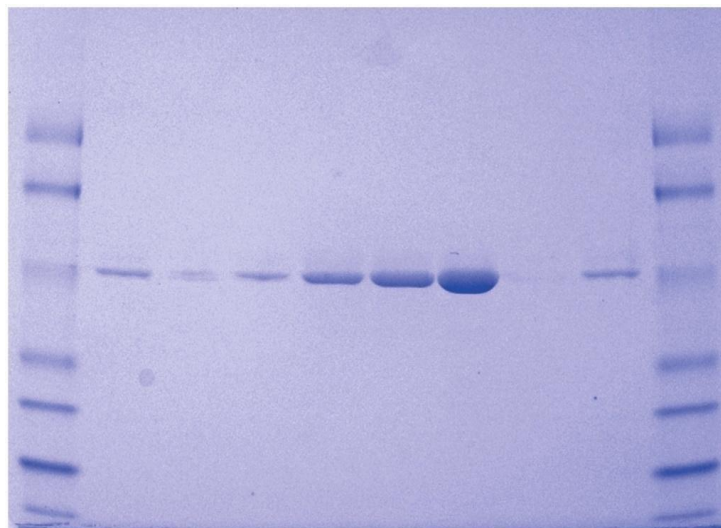


Figura 11. Resultado de una electroforesis SDS-PAGE con marcador de pesos moleculares en los carriles laterales. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

4) ¿Qué % de gel uso y cómo estimo el tamaño?

El % de acrilamida define el rango útil (**Tabla 4, Figura 12**):

- 7,5–10%: proteínas grandes (p. ej., 50–250 kDa).
- 12–15%: proteínas medianas-pequeñas (p. ej., 10–100 kDa).
- Gradientes (4–20%): rango amplio en una sola carrera.

Para estimar el peso molecular, trazamos una recta con el marcador: representamos logaritmo del peso molecular (KDa) frente a movilidad relativa. Se obtiene una recta de calibración. La movilidad de las proteínas desconocidas se compara con esta curva (**Figura 13**) y permite estimar su tamaño con buena aproximación.

Ejemplo clínico: biomarcadores en investigación para validar si una proteína candidata aparece sobreexpresada en un tejido tumoral.

Tabla 4. Porcentaje de gel de poliacrilamida y rango de pesos moleculares detectables (kDa).

Porcentaje	Rango Peso Molecular (kDa)
7,5	25-500
10	15-300
12	10-200
15	10-45
20	5-40

Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

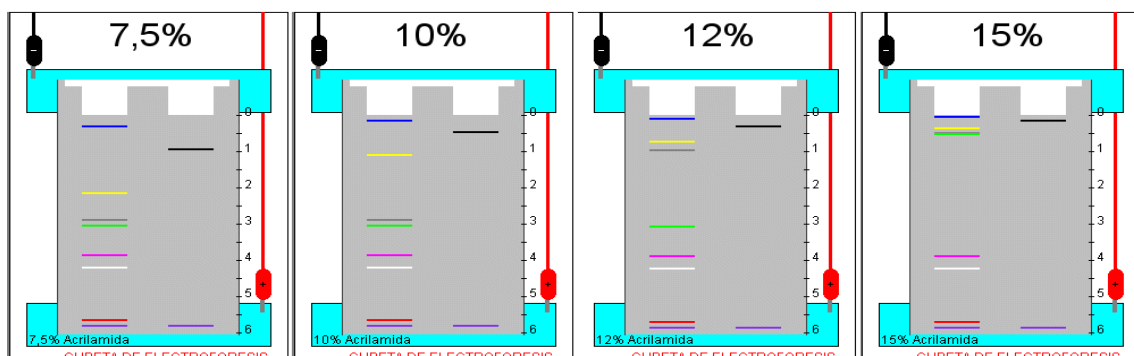


Figura 12. Separación de proteínas en gels de poliacrilamida con diferentes porcentajes de acrilamida. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

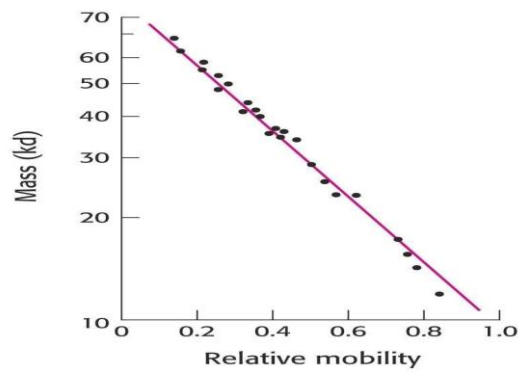


Figura 13. Curva de calibración en SDS-PAGE: relación entre movilidad relativa y peso molecular. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es una técnica que aprovecha una propiedad fundamental de las proteínas: cada una posee un punto isoeléctrico (pI), es decir, el valor de pH en el que su carga neta es cero.

Cuando colocamos una mezcla de proteínas en un gel con un gradiente de pH y aplicamos un campo eléctrico, cada proteína comienza a migrar hasta alcanzar la región donde el pH coincide con su pI. Si el medio tiene un pH menor que su pI, la proteína se carga positivamente y se moverá hacia el cátodo (-). En cambio, si el pH es mayor que su pI, la proteína adquiere carga negativa y migrará hacia el ánodo (+). En el punto exacto en el que la proteína no presenta carga neta, se detiene: allí queda “enfocada”.

Esto significa que proteínas que difieren en algo tan sutil como 0,01 unidades de pI pueden separarse en bandas distintas, lo que otorga al método una resolución extraordinaria.

En la **Figura 14**, la parte (A) ilustra cómo proteínas con distintas cargas van migrando dentro del gradiente de pH hasta alcanzar su equilibrio en el pI. La parte (B) muestra el resultado final: cada proteína se concentra en una banda definida, localizada exactamente en el punto isoeléctrico que le corresponde.

Este nivel de resolución es muy útil tanto en investigación como en clínica. Permite, por ejemplo, distinguir proteínas muy parecidas, como isoformas que solo difieren por una modificación postraduccional (fosforilación, glicosilación...). En medicina, se usa en el diagnóstico de variantes de hemoglobina en anemias hereditarias o en el estudio de

isoenzimas. Además, constituye una de las etapas clave en la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), donde primero se separan proteínas por pI y después por tamaño molecular.

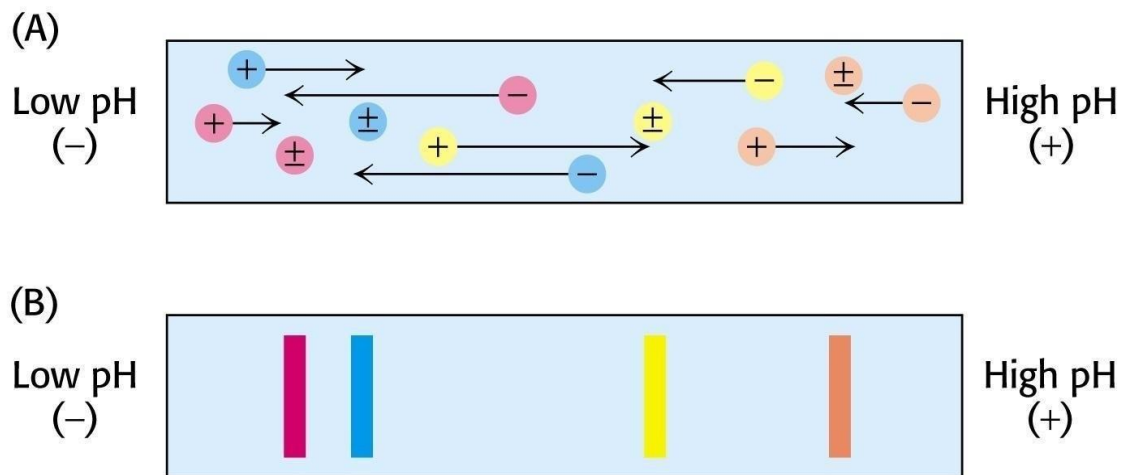


Figura 14. Principio del isoelectroenfoco: migración y enfoque de proteínas en un gradiente de pH. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

En el isoelectroenfoco, lo primero que se hace es establecer un gradiente de pH estable en el gel, añadiendo moléculas llamadas anfólitos, que se distribuyen creando un rango de pH definido, por ejemplo desde pH 3 hasta pH 9.

Después, se deposita la mezcla de proteínas en un pocillo del gel y se aplica un campo eléctrico (**Figura 15**). Bajo esta fuerza, cada proteína comienza a migrar a lo largo del gradiente hasta alcanzar la posición donde el pH coincide exactamente con su pI. En ese punto, al no tener carga neta, la proteína se detiene y queda “enfocada” en una franja muy estrecha del gel.

El resultado final es que, tras la tinción, observamos cómo las proteínas aparecen alineadas en bandas nítidas a lo largo del gel, cada una localizada en el pH que corresponde a su pI.

Este método, por tanto, no solo separa proteínas con gran precisión, sino que también permite diferenciar isoformas o variantes muy similares que difieren en una sola carga neta.

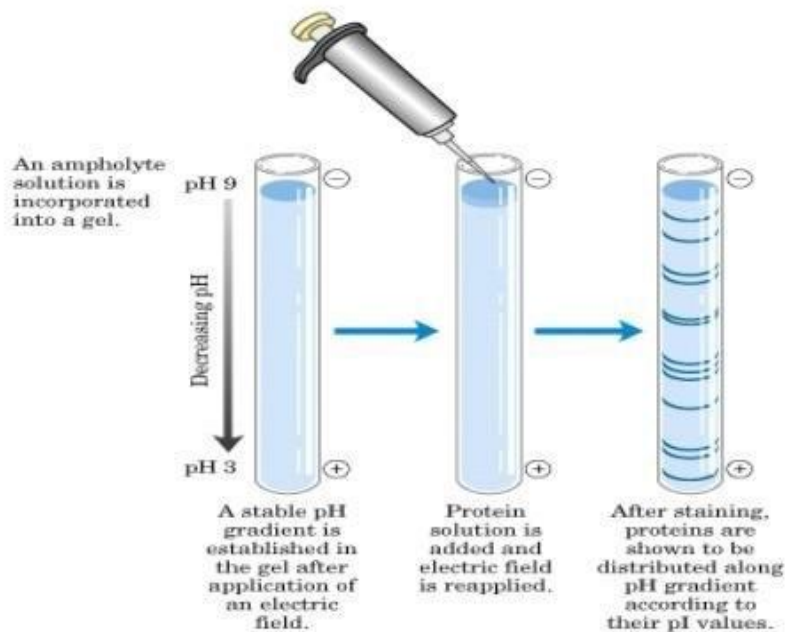


Figura 15. Separación de proteínas según su punto isoeléctrico en un gradiente de pH. 4. Lehninger. Principios de Bioquímica; D.L Nelson y M.M. Cox. Omega. 7ª ed. 2019.

Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional combina dos métodos de separación complementarios para lograr un altísimo poder de resolución: isoelectroenfoque y SDS-PAGE (**Figura 16**).

En la primera dimensión se aplica el isoelectroenfoque: las proteínas se separan en un gel con un gradiente de pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico (pI). De esta forma, cada proteína se detiene en la posición en la que su carga neta es cero.

Una vez separadas por pI, la franja del gel se coloca sobre un segundo gel, donde se realiza la segunda dimensión, que es una SDS-PAGE. En esta etapa, las proteínas se separan según su peso molecular, ya que el SDS les confiere la misma carga negativa proporcional a su tamaño y las hace migrar de acuerdo a su masa.

El resultado final es un mapa bidimensional donde cada proteína ocupa un punto definido: en el eje horizontal según su pI y en el eje vertical según su peso molecular. Es una herramienta clave en proteómica, ya que proporciona un perfil completo del proteoma de un tejido, célula o fluido biológico.

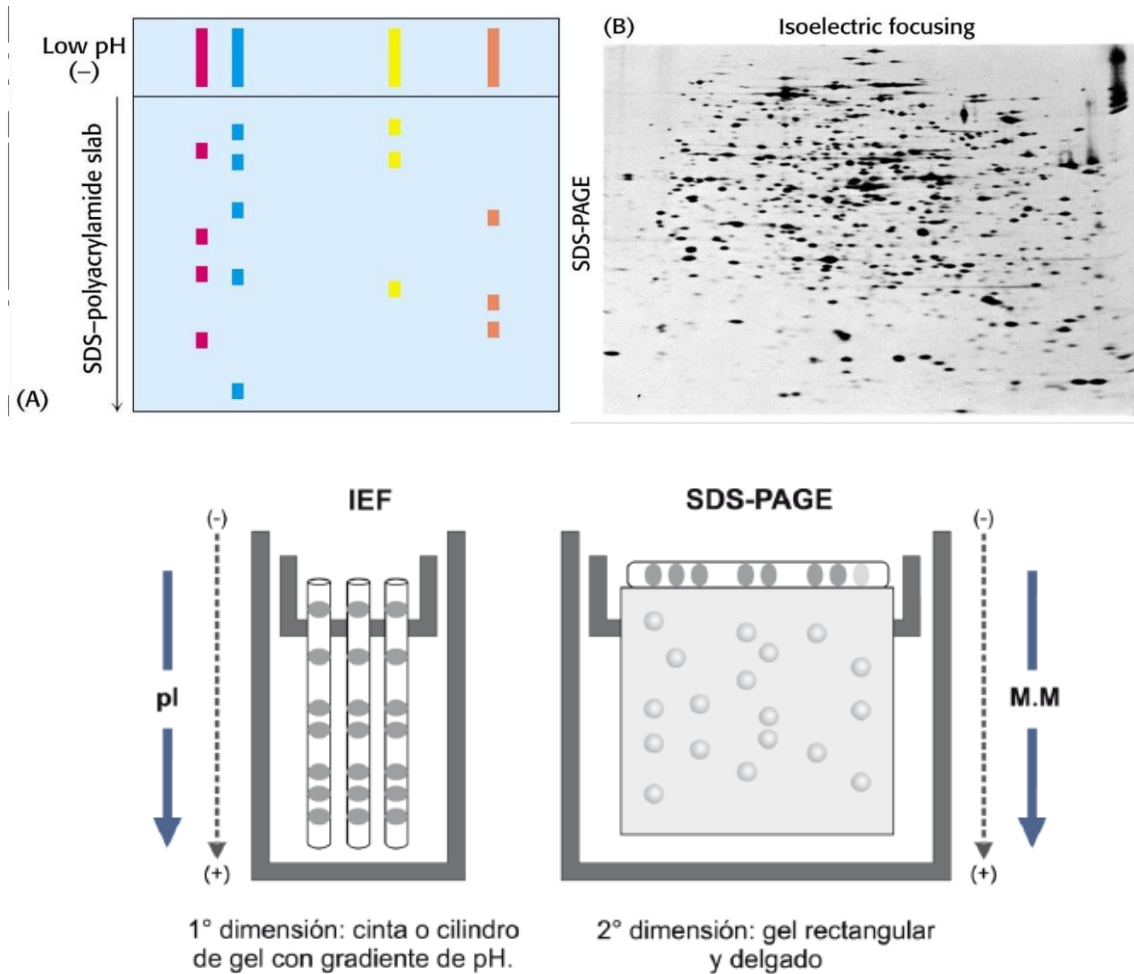


Figura 16. Principio y aplicación de la electroforesis bidimensional (2D-PAGE). Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Todas estas técnicas son las que realmente han permitido avanzar en la Medicina moderna: desde detectar variantes de hemoglobina en la diabetes hasta producir anticuerpos terapéuticos en el laboratorio. Si aprendéis a reconocerlas ahora, os resultará mucho más fácil entender diagnósticos, terapias y líneas de investigación en vuestra carrera.

6. Problemas habituales durante la purificación

La purificación de proteínas constituye un paso esencial en la investigación biomédica y en el desarrollo de aplicaciones clínicas y biotecnológicas. Sin embargo, se trata de un proceso complejo y con frecuencia problemático, ya que las proteínas son moléculas intrínsecamente frágiles, sensibles a las condiciones físico-químicas del entorno.

La purificación suele verse limitada por múltiples factores que reducen el rendimiento y comprometen la funcionalidad de la proteína aislada:

- **Bajo rendimiento:** durante los distintos pasos de purificación, una fracción significativa de la proteína de interés puede perderse, bien por adsorción a superficies, arrastre en fases de separación o ineficiencia de los métodos empleados. Esto se traduce en una recuperación muy inferior a la cantidad presente en la muestra inicial.
- **Inactivación:** la estabilidad estructural de las proteínas depende estrechamente de condiciones como el pH, la temperatura o la fuerza iónica. Alteraciones en estos parámetros pueden provocar desnaturalización, con la consiguiente pérdida de la actividad biológica o enzimática, incluso si la proteína se recupera en cantidad suficiente.
- **Agregación:** fuera de su entorno fisiológico, muchas proteínas tienden a interactuar entre sí formando agregados insolubles. Estos precipitados representan una pérdida de material funcional, ya que la proteína, aunque presente, no puede ser utilizada en estudios posteriores.
- **Proteólisis:** durante la lisis celular se liberan proteasas endógenas capaces de degradar otras proteínas. Si no se emplean inhibidores adecuados o condiciones que inactiven estas enzimas, la proteína de interés puede sufrir fragmentación parcial o completa, comprometiendo tanto su rendimiento como su actividad.

7. Evaluación de una purificación

La eficacia de un proceso de purificación no se determina únicamente por la separación física de componentes, sino por parámetros cuantitativos que permiten valorar tanto la cantidad como la calidad de la proteína de interés recuperada. Una purificación puede implicar pérdidas en cantidad absoluta, pero si el resultado final es una proteína más pura y funcional, el procedimiento se considera exitoso. Los criterios fundamentales de evaluación son los siguientes:

- **Proteína total:** corresponde a la cantidad global de proteínas presentes en la muestra, sin distinguir entre la proteína de interés y las proteínas acompañantes. Se determina mediante métodos generales, como la absorbancia a 280 nm (debida a los residuos aromáticos como triptófano y tirosina) o el ensayo de Bradford, que se basa en un cambio de coloración proporcional a la concentración de proteínas.

Ejemplo clínico: en el laboratorio clínico, los analizadores automáticos reportan la concentración de proteínas totales en suero utilizando principios similares.

- **Actividad total:** hace referencia a la suma de la actividad biológica atribuible a la proteína de interés en toda la muestra. No depende de la cantidad en mg recuperada, sino de la funcionalidad conservada.

Ejemplo clínico: en las determinaciones séricas de enzimas como ALT (alanina aminotransferasa) o LDH (lactato deshidrogenasa), lo que realmente se cuantifica es la actividad total de la enzima presente.

- **Actividad específica:** se define como la actividad de la proteína de interés expresada por cada mg de proteína total. Constituye un indicador directo de pureza: cuanto mayor es, más pura es la fracción obtenida.

Ejemplo: una mezcla compleja de proteínas mostrará baja actividad específica, mientras que una muestra enriquecida en la enzima de interés presentará un incremento notable de este valor.

- **Rendimiento:** indica el porcentaje de la actividad total inicial que se conserva tras el proceso de purificación. Es un parámetro clave para valorar la eficiencia global. Ejemplo: si se parte de 100 unidades de actividad en la muestra inicial y se conservan 40 tras el proceso, el rendimiento es del 40%.
- **Grado de purificación:** expresa la relación entre la actividad específica final y la actividad específica inicial, mostrando cuántas veces se ha enriquecido la proteína de interés respecto a la mezcla de partida. Ejemplo: si inicialmente la proteína representaba el 0,1% de la muestra total y tras la purificación constituye el 50%, el grado de purificación obtenido es muy elevado.

En un proceso de purificación de proteínas no basta con aplicar técnicas de separación: es fundamental medir cuantitativamente y evaluar visualmente la eficiencia de cada etapa.

- Parámetros numéricos: permiten valorar objetivamente la pureza, el rendimiento y la actividad de la proteína de interés (**Tabla 5**).
- Análisis cualitativo (gel de SDS-PAGE): proporciona una visión inmediata del grado de pureza alcanzado (**Figura 17**).

La purificación de proteínas siempre implica un equilibrio: a medida que aumenta la pureza, disminuye la cantidad recuperada. Por eso, parámetros como la actividad

específica, el rendimiento y el nivel de purificación son esenciales para valorar objetivamente la eficiencia de cada técnica.

En un protocolo de purificación, cada paso reduce la cantidad total de proteína, pero aumenta la pureza de la de interés. Esto se refleja en la siguiente tabla: aunque tras la cromatografía de afinidad solo quedan 1,75 mg de proteína, casi toda corresponde a la enzima buscada, con una actividad específica elevadísima y un grado de purificación 3.000 veces superior al inicial. El gel lo ilustra de forma visual: de un extracto lleno de bandas complejas pasamos a una única banda intensa, señal de que la proteína se ha aislado con éxito, aunque sacrificando parte del rendimiento.

Tabla 5. Evaluación cuantitativa de un proceso de purificación de proteínas.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity, (units mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification level
Homogenization	15,000	150,000	10	100	1
Salt fractionation	4,600	138,000	30	92	3
Ion-exchange chromatography	1,278	115,500	90	77	9
Molecular exclusion chromatography	68.8	75,000	1,100	50	110
Affinity chromatography	1.75	52,500	30,000	35	3,000

Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

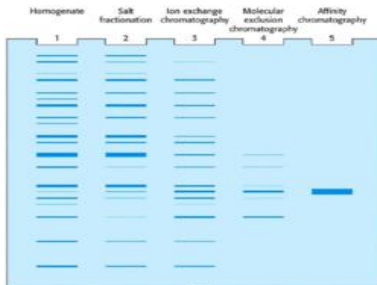


Figura 17. Evaluación visual de la purificación de proteínas mediante SDS-PAGE en distintas etapas del proceso. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

8. Determinación de la estructura primaria. Secuenciación de aminoácidos. Métodos clásicos

Hasta ahora hemos hablado de purificar proteínas y de medir su actividad. Pero si realmente queremos conocer a fondo una proteína, tenemos que empezar por lo más básico: su secuencia de aminoácidos, es decir, su estructura primaria.

La determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína fue, durante décadas, un paso fundamental en bioquímica antes de la llegada de las técnicas de secuenciación

masiva. Aunque hoy se utilizan métodos más modernos como la espectrometría de masas, los procedimientos clásicos siguen siendo muy didácticos porque muestran cómo se puede pasar de una molécula compleja a sus componentes básicos.

Etapas clásicas de la secuenciación de aminoácidos:

- 1) **Hidrólisis del péptido:** la primera etapa consiste en romper la proteína en sus aminoácidos constituyentes mediante hidrólisis ácida (por ejemplo, con HCl concentrado y calor). De este modo, se liberan todos los aminoácidos libres, que luego se pueden analizar de forma individual.
- 2) **Separación por intercambio iónico:** los aminoácidos se separan en una columna de cromatografía de intercambio iónico, que discrimina según la carga de cada uno. Se van eluyendo de la columna con un gradiente de pH o de concentración salina.
- 3) **Cuantificación con ninhidrina:** una vez separados, los aminoácidos se cuantifican gracias a la reacción con ninhidrina, que reacciona con el grupo amino para formar un complejo de color azul intenso.

Excepción: la prolina, al ser un aminoácido cíclico, genera un color amarillo característico.

La intensidad del color es proporcional a la concentración, y se mide por espectrofotometría. Este método es muy sensible: puede detectar hasta un microgramo de aminoácido.

- 4) **Uso de fluorescamina:** para aumentar la sensibilidad, se puede usar fluorescamina, que reacciona con grupos amino formando derivados fluorescentes. Esto permite detectar cantidades muchísimo menores, hasta el nivel de nanogramo, gracias a la alta sensibilidad de la fluorescencia.

Este método combina tres pasos básicos: hidrólisis - separación - detección. Con él, se podía reconstruir la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína, aunque hoy su principal valor es histórico y educativo.

La **Figura 18** muestra cómo, tras la hidrólisis completa de un péptido, los aminoácidos liberados se separan en una columna de cromatografía de intercambio iónico.

En el eje X se representa el volumen de elución, que corresponde al tiempo y orden en que los distintos aminoácidos van saliendo de la columna. En el eje Y, la absorbancia

refleja la cantidad detectada de cada aminoácido, gracias a su reacción con ninhidrina u otro reactivo específico.

Cada pico corresponde a un aminoácido concreto. Para saber cuál es cuál, se compara el perfil obtenido con un perfil estándar de aminoácidos puros (mostrado en la parte inferior). Así, por ejemplo, vemos que los picos principales en la muestra corresponden a Asp, Gly, Ala, Phe y Arg, porque coinciden en posición con los estándares.

El uso de diferentes tampones y valores de pH (como se indica abajo: pH 3.25, 4.25 y 5.28 con citrato sódico) permite ir modificando las condiciones de la columna y lograr que los distintos aminoácidos se eluyan de manera secuencial.

En conjunto, este perfil cromatográfico nos da una “huella digital” de la composición en aminoácidos de un péptido hidrolizado.

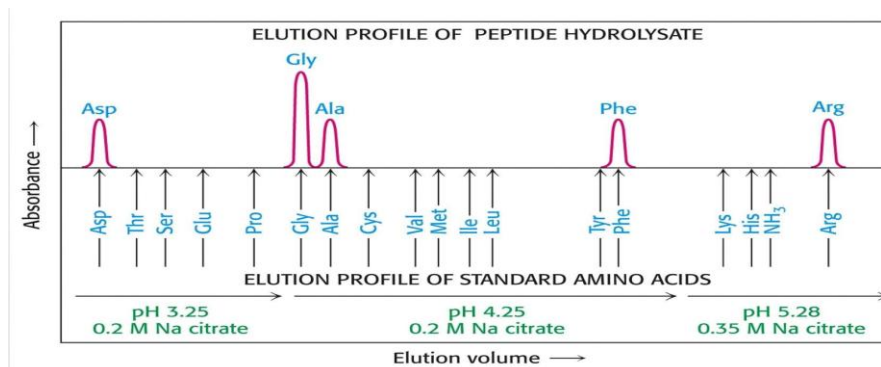


Figura 18. Perfil cromatográfico de un hidrolizado peptídico: separación e identificación de aminoácidos. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Degradación de Edman

Hasta ahora, lo que se hacía era romper el péptido entero, liberar todos los aminoácidos y luego identificarlos por cromatografía. El problema es que con ese método solo sabes qué aminoácidos están presentes y en qué proporción, pero no el orden en que están unidos. Hoy en día lo hacemos con espectrometría de masas, que es mucho más rápida y precisa. Pero históricamente, el método que revolucionó la bioquímica fue la Degradación de Edman.

La degradación de Edman es una técnica diseñada para secuenciar péptidos. Su principio es el siguiente (**Figura 19**): en lugar de romper toda la cadena, se van eliminando de

manera secuencial los residuos de aminoácidos, uno a uno, desde el extremo amino terminal (N-terminal).

El reactivo clave es la fenilisotiocianato (PITC), que reacciona con el grupo amino libre del primer residuo. Tras una serie de pasos químicos, ese aminoácido se libera como un derivado estable (feniltiohidantoína, PTH-aa), que se puede identificar por cromatografía.

Lo importante es que el resto del péptido queda intacto, solo que ahora con un aminoácido menos, por lo que el proceso puede repetirse de forma cíclica. Así, en cada ciclo identificamos un aminoácido y vamos reconstruyendo la secuencia completa.

En el cromatograma se ve el resultado (**Figura 20**): cada pico corresponde al aminoácido liberado en un ciclo de degradación. A medida que avanza el tiempo de elución, se van detectando los residuos en el orden en que estaban en la cadena original.

Esta técnica tiene la limitación de que solo se podían leer unas 40–50 posiciones seguidas antes de que la reacción perdiera resolución. Por tanto, no era útil para proteínas muy largas y requería proteínas relativamente puras. Por ello, poco a poco fue sustituido por la espectrometría de masas, que permite leer secuencias completas en mucho menos tiempo.

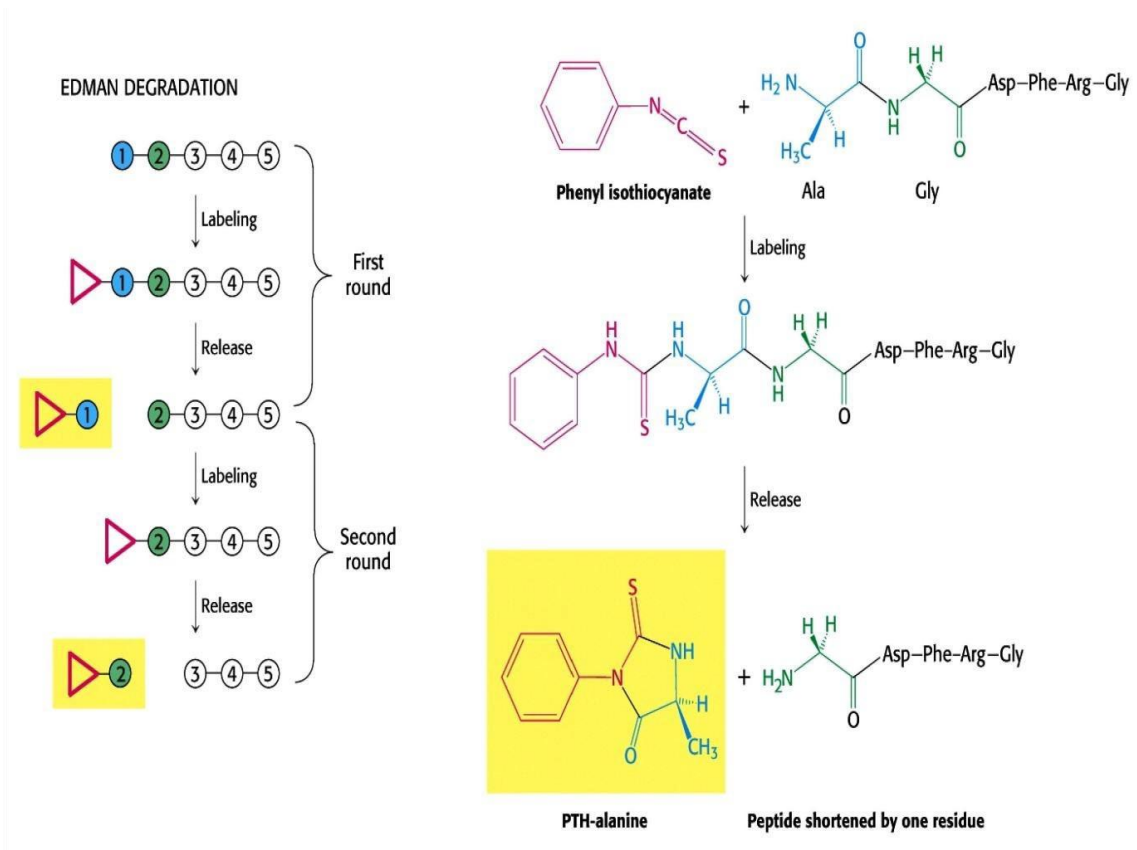


Figura 19. Degradación de Edman. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

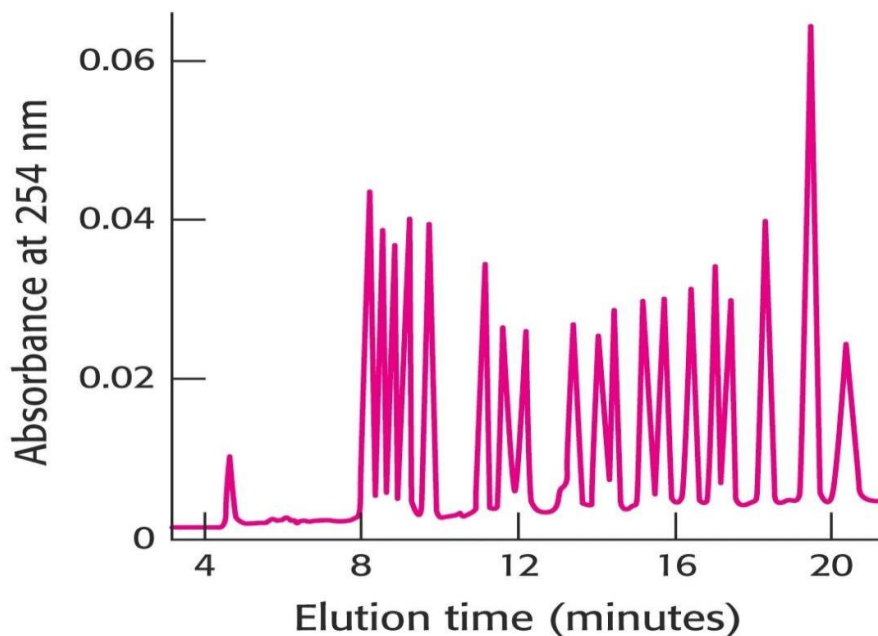


Figura 20. Cromatograma típico de una degradación de Edman. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Fragmentación y ensamblaje de proteínas

Cuando trabajamos con proteínas largas (con cientos de aminoácidos), no podemos secuenciarlas con métodos como la degradación de Edman o la espectrometría de masas. La solución es fragmentarlas en trozos más pequeños y manejables, que después se analizan por separado y finalmente se ensamblan como las piezas de un puzzle.

El proceso comienza con la reducción de los puentes disulfuro. Muchas proteínas poseen enlaces –S–S– que mantienen unidas distintas regiones de la cadena. Antes de fragmentar, hay que “desatar estos nudos”, usando agentes reductores como el dithiothreitol (DTT) o el β-mercaptoetanol, y luego bloqueando los grupos –SH con yodoacetato para evitar que los puentes vuelvan a formarse. En otros casos, se utiliza ácido per fórmico, que oxida los enlaces disulfuro y convierte las cisteínas en ácido cisteico. Esto no solo permite separar las cadenas, sino también mapear la posición de los puentes disulfuro mediante técnicas como la electroforesis bidimensional. Una vez linealizada la proteína, llega el momento de aplicar las “tijeras moleculares”. Tenemos dos grandes estrategias:

- Química, como el bromuro de cianógeno, que corta específicamente en el lado carboxílico de las metioninas (**Figura 21**).

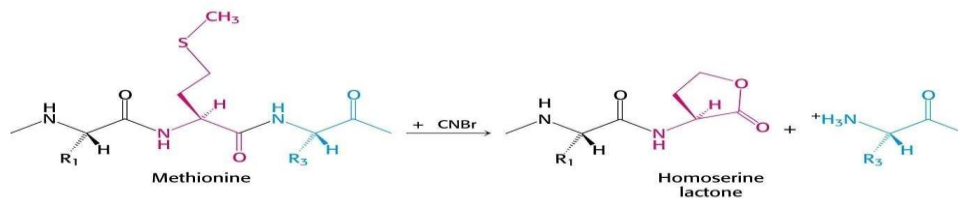


Figura 21. Escisión química por bromuro de cianógeno. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

- Enzimática, utilizando proteasas como la tripsina (corta tras lisina y arginina) o la quimotripsina (tras aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina o triptófano) (**Figura 22**).

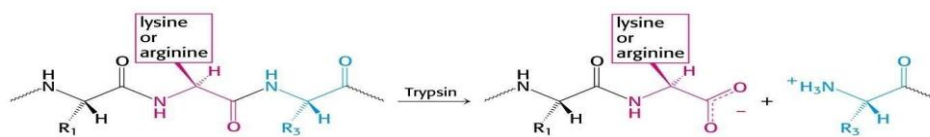


Figura 22. Escisión enzimática de péptidos catalizada por tripsina. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Cada método produce fragmentos definidos y reproducibles, en lugar de cortes aleatorios. El siguiente paso es el análisis de fragmentos. Antiguamente, se hacía con degradación de Edman, pero hoy la técnica más utilizada es la espectrometría de masas (MS/MS), que identifica con gran precisión la composición de cada péptido. Lo importante es que distintos métodos de corte generan péptidos solapantes: regiones que se repiten entre fragmentos. Gracias a esos solapamientos podemos ensamblar la secuencia completa, igual que con las piezas de un rompecabezas. Finalmente, al recomponer todos los fragmentos, obtenemos la secuencia completa de la proteína, que a su vez nos permite predecir y representar su estructura tridimensional.

Las proteínas largas no se leen de una vez. Primero se reducen y desenredan, luego se fragmentan con “tijeras” químicas o enzimáticas, se analizan por separado y, finalmente, se ensamblan gracias a péptidos solapantes. Esta estrategia fue clave en la historia de la bioquímica, por ejemplo, para descifrar la insulina, y hoy sigue siendo la base de la proteómica moderna.

9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos

Descifrar la secuencia de aminoácidos de una proteína no es simplemente obtener una lista de “letras químicas”: es acceder a un manual de instrucciones que revela función, evolución, destino celular e implicaciones clínicas.

- **Función:** muchas proteínas contienen motivos funcionales, pequeños fragmentos de secuencia compartidos en familias distintas. Un ejemplo clásico son las serín-proteasas, que poseen la tríada catalítica Ser–His–Asp. Identificar este motivo en una proteína nueva permite predecir su actividad enzimática incluso antes de conocer su estructura 3D.
- **Evolución:** la secuencia también actúa como un “fósil molecular”. Comparar proteínas entre especies permite reconstruir árboles filogenéticos: el citocromo c es un ejemplo paradigmático, pues muestra cómo organismos tan diferentes como levaduras y humanos comparten un mismo lenguaje químico.
- **Destino celular:** algunas regiones de la secuencia funcionan como códigos postales moleculares, que dirigen la proteína a su localización correcta.
 - Péptidos señal: envío al retículo endoplásmico (si será secretada).
 - Secuencias específicas: guían a mitocondrias o núcleo. Sin estas señales, las proteínas se perderían dentro de la célula.

- **Relevancia clínica:** una sola mutación puede cambiarlo todo. Sustituir un aminoácido puede bastar para perder la función.

Ejemplo: la distrofina. Mutaciones en su secuencia causan distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad grave asociada a la ausencia de esta proteína esencial.

10. Métodos de análisis estructural avanzado

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica de gran potencial que nos permite elucidar estructuras químicas. Su principio básico es la medición de la relación masa/carga (m/z) de especies moleculares. Para ello, es necesario generar iones, lo cual puede lograrse por diferentes metodologías clásicas como el impacto electrónico, el bombardeo de átomos rápidos (FAB) o el análisis directo en tiempo real (DART). La determinación de m/z no solo permite identificar moléculas, sino también calcular su peso molecular exacto.

En el ámbito clínico, la espectrometría de masas ha supuesto una revolución, sustituyendo a métodos clásicos como la degradación de Edman. Hoy en día, técnicas como MALDI (ionización por láser asistida por matriz) o ESI (ionización por electrospray) permiten fragmentar proteínas en péptidos cargados, separarlos según su masa/carga y detectarlos con gran sensibilidad. Cada proteína genera así un espectro característico de picos (**Figura 23**), que actúa como una verdadera huella digital.

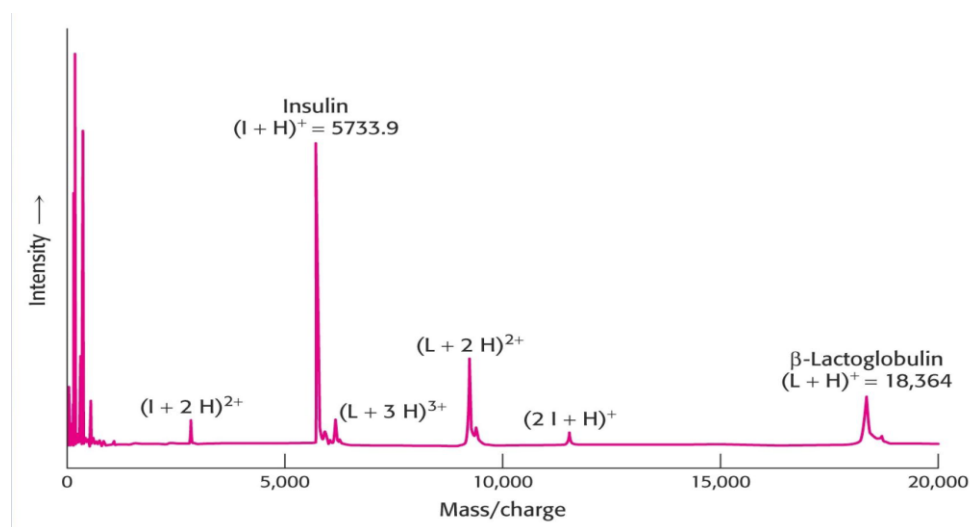


Figura 23. Espectro de masas de proteínas: identificación de insulina y β -lactoglobulina según su relación masa/carga (m/z). Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

Esto nos permite:

- Identificar proteínas comparando con bases de datos.
- Detectar modificaciones postraduccionales (fosforilación, glucosilación, acetilación).
- Cuantificar proteínas en distintas condiciones biológicas, lo que es la base de la proteómica diferencial.

Más allá del análisis de una proteína aislada, la espectrometría de masas ha dado origen a la **proteómica**, la disciplina que estudia de forma global todas las proteínas expresadas en un tejido, fluido o célula. Esta visión de conjunto permite detectar no solo qué proteínas están presentes, sino también sus modificaciones y variaciones en distintas condiciones fisiológicas o patológicas. Gracias a ello se han identificado biomarcadores diferenciales, como troponinas en cardiología o β -amiloide y tau fosforilada en neurología, que hoy son parte esencial de la práctica clínica.

Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X fue uno de los grandes hitos que revolucionó la biología molecular. Mientras que la espectrometría de masas nos da la secuencia y la composición de una proteína, la cristalografía nos permite dar un paso más y observar su estructura tridimensional, átomo por átomo.

El procedimiento consiste en:

- 1) **Cristalización:** la proteína debe organizarse en un cristal ordenado, lo cual puede ser difícil, especialmente con proteínas de membrana.
- 2) **Difracción:** el cristal se expone a un haz de rayos X, que se dispersa al chocar con los electrones de la proteína.
- 3) **Reconstrucción:** el patrón de difracción obtenido se analiza mediante cálculos matemáticos, produciendo un mapa electrónico 3D que revela la disposición atómica de la proteína.

Aunque el proceso puede llevar meses o incluso años, el nivel de detalle que ofrece es insustituible. Un ejemplo histórico es la resolución de la estructura de la hemoglobina por Max Perutz y John Kendrew, un trabajo que les valió el Premio Nobel en 1962. Gracias

a ello pudimos entender cómo la hemoglobina transporta oxígeno y qué ocurre en enfermedades como la anemia falciforme o la talasemia.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica fascinante porque, mientras la cristalografía de rayos X nos ofrece una foto fija y estática de la proteína, la RMN nos da algo parecido a una película en movimiento. Nos permite estudiar las proteínas directamente en disolución, en condiciones más parecidas a las fisiológicas, y observar cómo cambian de conformación.

El principio se basa en el comportamiento magnético de ciertos núcleos atómicos como el hidrógeno (^1H), el carbono-13 (^{13}C) o el nitrógeno-15 (^{15}N). Cuando colocamos una proteína en un campo magnético muy intenso y excitamos estos núcleos con ondas de radiofrecuencia, obtenemos un espectro lleno de resonancias. Analizando esas señales, podemos reconstruir un mapa tridimensional de la proteína y, lo más interesante, seguir sus movimientos internos.

La gran ventaja de la RMN es que no necesitamos cristales: podemos estudiar proteínas tal cual en solución, lo cual es ideal para moléculas pequeñas y flexibles, por debajo de 30 kDa. Además, nos da información única sobre la dinámica molecular: cómo se doblan, cómo se mueven ciertas regiones o qué cambios estructurales se producen al unirse a un ligando o al sufrir una modificación.

Eso sí, no todo son facilidades. La RMN requiere grandes cantidades de proteína muy pura, mucho tiempo de análisis, y deja de ser práctica con proteínas demasiado grandes o complejas.

En biomedicina tiene aplicaciones muy potentes. Por ejemplo, se usa para estudiar péptidos antimicrobianos y observar cómo cambian de estructura al interactuar con membranas bacterianas. También ha sido clave en el estudio de proteínas intrínsecamente desordenadas, implicadas en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson, que no se pueden estudiar bien con métodos clásicos porque no forman estructuras rígidas.

En definitiva, la RMN complementa perfectamente a la cristalografía: nos recuerda que las proteínas no son esculturas inmóviles, sino moléculas dinámicas y vivas, que cambian constantemente de forma para poder cumplir su función.

11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial

La bioinformática ha sido el primer gran motor de la proteómica moderna. Gracias a bases de datos como UniProt, que recoge secuencias y anotaciones de proteínas, o el Protein Data Bank (PDB), que almacena estructuras tridimensionales resueltas experimentalmente, es posible identificar proteínas, predecir motivos funcionales y explorar modificaciones postraduccionales. Estos recursos, junto con algoritmos de alineamiento y modelado, permiten transformar datos brutos de espectrometría de masas en conocimiento aplicable, y constituyen el punto de partida para la medicina personalizada.

En los últimos años, la inteligencia artificial (IA) ha dado un salto cualitativo con programas como AlphaFold, capaces de predecir la estructura tridimensional de proteínas directamente a partir de su secuencia de aminoácidos con una precisión comparable a la cristalografía de rayos X. Entrenada con miles de estructuras depositadas en el PDB, esta red neuronal ha permitido generar modelos fiables de prácticamente cualquier proteína, incluidas muchas que nunca se habían podido estudiar experimentalmente. Así, la IA complementa a las técnicas clásicas y bioinformáticas, acelerando el descubrimiento de biomarcadores, el diseño de fármacos y el desarrollo de la medicina de precisión.

12. Métodos de análisis funcional e inmunológico

Hasta este punto hemos hablado de proteínas desde el lado estructural y bioquímico, pero ahora damos un paso hacia algo que vais a ver a diario en la práctica médica: la interacción entre antígenos y anticuerpos. Este binomio no solo es la base de la inmunidad, sino también de muchísimas pruebas diagnósticas y de terapias modernas.

Un antígeno es cualquier molécula capaz de inducir una respuesta inmune: puede ser una proteína, un polisacárido, un lípido o incluso un fragmento de ADN. Frente a él, el sistema inmunitario fabrica anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas), que son proteínas producidas por linfocitos B. La idea clave es que cada anticuerpo reconoce con altísima precisión un fragmento específico del antígeno, al que llamamos epítipo. Es el paradigma de “una llave que encaja en una cerradura”.

En cuanto a su estructura, los anticuerpos tienen la forma clásica de Y. Están compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y presentan dos regiones fundamentales: la región variable (Fab), que es la que reconoce al antígeno, y la región constante (Fc),

que define la clase de inmunoglobulina y media funciones efectoras como la activación del complemento o la unión a células NK.

Podemos distinguir dos grandes tipos:

- Los anticuerpos policlonales, que son una mezcla producida por distintos clones de linfocitos B. Reconocen múltiples epítomos de un mismo antígeno. Son fáciles y rápidos de obtener, aunque menos específicos y más variables.
- Los anticuerpos monoclonales, que reconocen un único epítomo. Se producen mediante la técnica de los hibridomas (fusión de un linfocito B con una célula tumoral inmortalizada), lo que permite fabricar indefinidamente un anticuerpo único y muy específico. Esta técnica revolucionó la biomedicina y le valió el Premio Nobel a Köhler y Milstein en 1984.

En la práctica, este conocimiento se traduce en aplicaciones directas. Hoy, los anticuerpos monoclonales terapéuticos son auténticos fármacos de precisión. Por ejemplo, el rituximab, dirigido contra CD20 en linfocitos B, se emplea en linfomas y enfermedades autoinmunes. O el trastuzumab (Herceptin), que actúa contra HER2 y ha transformado el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

Los anticuerpos son proteínas con una especificidad asombrosa, capaces de reconocer su antígeno con total exactitud. Y gracias a esta propiedad, hoy podemos diagnosticar enfermedades mediante técnicas inmunológicas y también tratarlas con anticuerpos monoclonales, que se han convertido en un pilar central de la medicina de precisión.

Después de ver cómo funcionan los anticuerpos, ahora toca entender cómo los obtenemos en el laboratorio. Existen dos grandes estrategias: policlonales y monoclonales.

Anticuerpos policlonales

- **Cómo se obtienen:**
 - 1) Se inmuniza un animal (conejo, cabra, etc.) con el antígeno de interés.
 - 2) Su sistema inmune genera una batería de anticuerpos diferentes, cada uno dirigido contra distintos epítomos de ese antígeno.
 - 3) Al recoger el suero, obtenemos una mezcla heterogénea de anticuerpos.

4) Posteriormente, pueden purificarse los específicos para el antígeno de interés.

- **Ventajas:** fáciles y rápidos de producir, muy sensibles.
- **Inconvenientes:** variabilidad entre lotes, ya que cada animal responde de manera distinta.

Anticuerpos monoclonales

- **Cómo se obtienen (tecnología de los hibridomas):**
 - 1) Se inmuniza un ratón con el antígeno.
 - 2) Se extraen sus linfocitos B productores de anticuerpos.
 - 3) Esas células se fusionan con células de mieloma, dando lugar a hibridomas, células inmortales que producen anticuerpos.
 - 4) Cada hibridoma produce un único anticuerpo contra un epítipo concreto.
 - 5) Se selecciona y expande el clon deseado → producción ilimitada de un anticuerpo idéntico.
- **Ventajas:** altísima especificidad, homogeneidad, reproducibilidad lote a lote.
- **Inconvenientes:** proceso más costoso y complejo.

Técnicas inmunológicas

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

El ELISA es probablemente la técnica inmunológica más utilizada, tanto en investigación como en diagnóstico. Su lógica es sencilla: usamos un anticuerpo unido a una enzima para transformar una interacción invisible, la unión entre antígeno y anticuerpo, en algo visible, normalmente un cambio de color. Cuanto más intenso es el color, mayor es la cantidad de la molécula que estamos buscando.

Existen dos formatos principales (**Figura 24**):

- **ELISA indirecto:** fijamos el antígeno en el pocillo. Si en la muestra hay anticuerpos frente a ese antígeno, se unirán. Luego añadimos un anticuerpo secundario, que está marcado con una enzima, y finalmente un sustrato. El

resultado es un cambio de color que nos dice si había anticuerpos en la muestra. Un ejemplo clínico es la detección de anticuerpos frente al VIH.

- **ELISA tipo sándwich:** el pocillo está recubierto con un anticuerpo específico, que captura directamente el antígeno de la muestra. Luego añadimos un segundo anticuerpo, también específico pero marcado con enzima, que reconoce otro epítipo del mismo antígeno. Al añadir el sustrato, de nuevo se produce un cambio de color. Este formato se utiliza mucho para medir proteínas en clínica, como la troponina en el infarto de miocardio o el PSA en el cribado de cáncer de próstata.

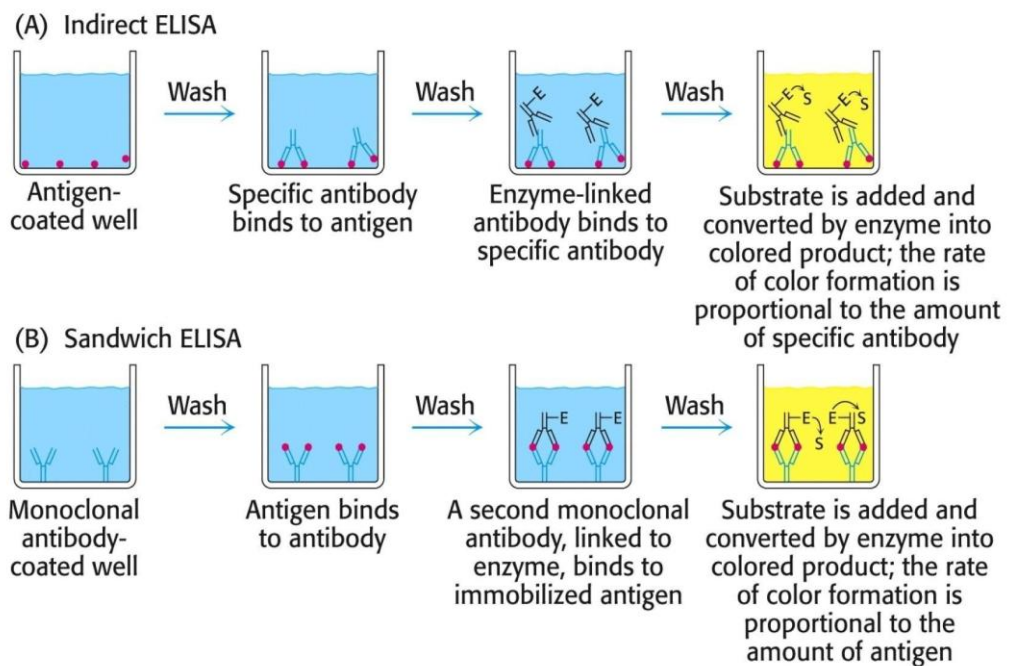


Figura 24. Principales formatos de ELISA: indirecto (A) y tipo sándwich (B). Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

La idea principal es que, en ambos casos, unimos la especificidad del anticuerpo con la facilidad de leer un cambio de color. Eso es lo que ha hecho del ELISA una técnica universal en diagnóstico clínico.

Un ejemplo cotidiano que conecta directamente con la vida real: un test de embarazo funciona como un ELISA en formato rápido. Detecta la hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en orina gracias a anticuerpos específicos unidos a una enzima o a partículas coloreadas. Si la hormona está presente, se forma una línea visible en la tira.

Western blot

El Western blot es una técnica esencial para identificar proteínas específicas dentro de una mezcla compleja. Su lógica combina dos pasos:

- 1) **Separación:** primero separamos las proteínas por tamaño mediante SDS-PAGE.
- 2) **Transferencia y detección:** las proteínas se transfieren a una membrana, que actúa como un “papel secante” donde quedan fijadas.

En la membrana, bloqueamos los sitios libres para evitar uniones inespecíficas y aplicamos un anticuerpo primario, que reconoce solo a la proteína de interés. Después añadimos un anticuerpo secundario unido a una enzima o fluoróforo, que amplifica la señal. Al añadir el sustrato, se genera una reacción detectable, generalmente como una banda visible.

En la práctica, lo que conseguimos es darle un “carnet de identidad” a una proteína concreta: entre todas las que estaban presentes en la muestra, ahora podemos confirmar no solo que está, sino también en qué cantidad y con qué tamaño aparente. Por eso el Western blot es tan utilizado tanto en investigación básica como en diagnóstico clínico, desde la confirmación del VIH hasta el estudio de proteínas asociadas a cáncer o enfermedades neuromusculares.

Reacción de comprobación tras la obtención de enzimas

La purificación de una proteína, y en particular de una enzima, no se considera completa únicamente con la obtención de una banda definida en un gel de electroforesis o en un Western blot. El criterio fundamental es determinar si la proteína conserva su actividad biológica.

Para ello, tras cada proceso de purificación se realiza un ensayo funcional, consistente en añadir el sustrato específico de la enzima en condiciones controladas y cuantificar la formación del producto. La detección de actividad catalítica confirma que la proteína no solo se ha purificado, sino que mantiene su función.

Este tipo de comprobación tiene también aplicaciones clínicas. Por ejemplo, la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) se evalúa en suero como marcador de daño hepático, mientras que la fosfatasa alcalina se utiliza como indicador de alteraciones óseas o hepatobiliares.

En conclusión, la purificación de una enzima no constituye un fin en sí mismo; lo esencial es verificar que la proteína retiene su función biológica tras el proceso.

13. Aplicaciones biomédicas y moleculares. Síntesis de péptidos.

Hasta ahora hemos trabajado con proteínas tal y como existen en la naturaleza, pero la biomedicina moderna va un paso más allá: hoy podemos fabricar péptidos sintéticos en el laboratorio. Un péptido sintético no es más que una pequeña cadena de aminoácidos construida de forma artificial, donde controlamos a voluntad la secuencia. Eso nos da una herramienta poderosísima, porque podemos diseñar fragmentos con funciones específicas.

¿Cómo se hace? El método más utilizado es la síntesis en fase sólida. Imaginad que anclamos un aminoácido a una resina como si fuera una pared. A partir de ahí, vamos añadiendo uno a uno los siguientes aminoácidos, pero con grupos protectores que evitan uniones no deseadas. En cada ciclo desprotegemos, acoplamos el siguiente residuo y repetimos hasta completar la secuencia. Al final, liberamos el péptido de la resina y ya tenemos el producto terminado. Es como ir montando un collar, perla a perla, pero con aminoácidos.

¿Y para qué sirve todo esto? Las aplicaciones son enormes:

- En investigación, podemos usar péptidos sintéticos como antígenos para generar anticuerpos específicos.
- En clínica, se utilizan en vacunas peptídicas frente a virus o tumores.
- También se diseñan péptidos antimicrobianos, inspirados en nuestras defensas naturales.
- Y muchos se han convertido en auténticos fármacos, como los análogos del GLP-1 para la diabetes y la obesidad, o la calcitonina sintética para la osteoporosis.

Activación de péptidos

Para que dos aminoácidos se unan, necesitamos formar un enlace peptídico entre el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) de uno y el grupo amino ($-\text{NH}_2$) del siguiente. El problema es que, de manera natural, esta reacción es muy lenta y poco eficiente.

Por eso, en síntesis química usamos un reactivo activador que convierte el grupo carboxilo en una forma mucho más reactiva, lista para unirse al grupo amino del siguiente aminoácido.

En otras palabras, es como preparar una pieza antes de encajarla en un puzzle: si no la activamos, no encaja.

Ejemplo clásico de activador: la diciclohexilcarbodiimida (DCC), que transforma el carboxilo en un intermedio reactivo y facilita que se forme el enlace peptídico.

Además, como los aminoácidos tienen varios grupos funcionales, usamos grupos protectores (como Boc o Fmoc) para asegurarnos de que solo reacciona el extremo que nos interesa. Así evitamos errores en la secuencia.

Síntesis de péptidos por el método en fase sólida (Merrifield, Nobel 1984)

La síntesis en fase sólida revolucionó la bioquímica porque permitió construir péptidos de manera rápida y controlada, aminoácido por aminoácido.

El truco está en fijar el primer aminoácido a una resina sólida (pequeñas bolitas plásticas inertes). A partir de ahí, se van añadiendo los demás aminoácidos de uno en uno.

Etapas principales

- 1) **Anclaje:** el primer aminoácido se une por su extremo carboxilo a la resina sólida. Esto lo deja fijo, como si fuera el “punto de inicio” de la cadena.
- 2) **Desprotección:** el grupo amino de ese aminoácido está protegido químicamente para evitar reacciones indeseadas. En este paso se retira el protector (ej. Fmoc o Boc), dejando libre el extremo amino para poder reaccionar.
- 3) **Acoplamiento:** se activa el siguiente aminoácido (mediante reactivos como la DCC) para que su grupo carboxilo sea muy reactivo. Ese carboxilo activado se une al grupo amino libre del aminoácido anterior, formando el nuevo enlace peptídico.
- 4) **Repetición del ciclo:** el proceso de desprotección + acoplamiento se repite tantas veces como aminoácidos tenga la secuencia. Cada ciclo añade un nuevo residuo a la cadena.

- 5) **Liberación del péptido:** una vez terminada la secuencia, se corta el enlace con la resina y se eliminan los grupos protectores laterales. El resultado es el péptido libre y con la secuencia deseada.

Ventajas del método

- Alta eficiencia y control en la secuencia.
- Permite sintetizar péptidos relativamente largos con pureza elevada.
- Ha abierto la puerta al desarrollo de vacunas peptídicas, fármacos, sondas moleculares y herramientas de investigación.

14. Terapia génica

Hasta ahora hemos hablado de cómo purificar proteínas, analizarlas e incluso sintetizarlas en el laboratorio. Pero, ¿qué ocurre cuando el problema es más profundo, cuando la célula ni siquiera fabrica la proteína correcta? En esos casos, dar proteínas purificadas no basta. La solución pasa por ir al origen: devolver a la célula las instrucciones para que sea ella misma la que produzca la proteína. Eso es, en esencia, la terapia génica.

La definición es sencilla: consiste en introducir material genético en las células para corregir un defecto o inducir la síntesis de una proteína terapéutica. Aunque hablemos de genes y ADN, el objetivo final de toda terapia génica son siempre proteínas. En el fondo, no es más que una terapia proteica a través del ADN.

Un ejemplo muy ilustrativo es la distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad devastadora causada por la ausencia de distrofina, proteína que mantiene la estabilidad de las fibras musculares. La estrategia de terapia génica consiste en introducir una copia funcional del gen de la distrofina en células musculares. De esta forma, las células vuelven a producir la proteína y se recupera parte de la función perdida.

La terapia génica devuelve a la célula la capacidad de producir la proteína que faltaba. Siempre aprendemos la dirección clásica de la biología molecular: ADN → ARN → proteína. Pero la bioquímica moderna nos permite hacer también el camino inverso. Si conocemos la secuencia de aminoácidos de una proteína, podemos deducir el gen que la codifica gracias al código genético universal.

Es cierto que el código es degenerado (varios codones pueden codificar el mismo aminoácido) (**Figuras 25 y 26**), pero existen algoritmos bioinformáticos capaces de

reconstruir la secuencia probable de ADN. Esto ha permitido identificar genes, clonarlos y producir proteínas recombinantes.

Un ejemplo paradigmático es la insulina. Durante mucho tiempo se obtenía de páncreas de animales como vacas o cerdos. Sin embargo, al conocer la secuencia de aminoácidos se pudo deducir el gen, clonarlo en bacterias y levaduras, y producir insulina recombinante humana de manera masiva y segura.

Una proteína alterada en un paciente puede ser la pista inicial para identificar el gen responsable, clonarlo y desarrollar una terapia que corrija la enfermedad. Así, la bioquímica de proteínas conecta directamente la investigación básica con las terapias avanzadas de la medicina moderna.

		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primera letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Alto UAG Alto	UGU } Cys UGC } UGA Alto UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G
						Tercera letra

Figura 25. Código genético universal: correspondencia entre tripletes de ARN mensajero (codones) y aminoácidos. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

DNA sequence GGG | TTC | TTG | GGA | GCA | GCA | GGA | AGC | ACT | ATG | GGC | GCA |

Amino acid sequence Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala

Figura 26. Traducción de una secuencia de ADN a su correspondiente secuencia de aminoácidos. Adaptada de material docente y de libros de referencia (Nelson & Cox *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Devlin *Biochemistry with Clinical Correlations*; Baynes & Dominiczak *Bioquímica médica*).

15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento

Cuando hablamos de proteínas, no nos quedamos en el laboratorio. La investigación básica que comienza con su purificación y caracterización puede terminar, años después, salvando vidas en un hospital. Ese es el recorrido de la ciencia traslacional: llevar un hallazgo molecular hasta la práctica clínica.

El flujo suele ser claro:

- 1) **Laboratorio básico:** los investigadores formulan preguntas fundamentales: ¿qué hace esta proteína?, ¿cómo se pliega?, ¿qué ocurre si se modifica?
- 2) **Investigación clínica:** se identifican proteínas alteradas en enfermedades y se validan como biomarcadores que ayudan a diagnosticar, clasificar pacientes o predecir evolución.
- 3) **Práctica hospitalaria:** esos biomarcadores se incorporan a pruebas rutinarias y, en muchos casos, sirven de base para terapias dirigidas.

El ejemplo paradigmático es HER2 en cáncer de mama:

- 1) **Etapa básica:** se observó que algunas pacientes tenían sobreexpresión de esta proteína de membrana en las células tumorales.
- 2) **Etapa clínica:** se validó como biomarcador, identificando tumores HER2 positivos como más agresivos.
- 3) **Etapa terapéutica:** se desarrolló el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin), que bloquea específicamente HER2. Hoy, prescribir trastuzumab es estándar en oncología, y ha transformado la supervivencia de miles de pacientes.

16. Conclusiones

Llegamos al final del seminario. Hemos recorrido un viaje que empezó con lo más elemental, qué es una proteína y por qué nos importa, y hemos terminado en la frontera de la medicina de precisión. Tres ideas clave:

- **Las técnicas son herramientas, no un fin en sí mismas.** Hemos visto cromatografía, electroforesis, espectrometría de masas, ELISA... pero todas

responden a una misma pregunta: “¿*qué proteína hay aquí y qué está haciendo?*”. No se trata de memorizar nombres de métodos, sino de comprender cómo se aplican para resolver problemas clínicos reales.

- **La bioquímica de proteínas es el puente entre el laboratorio y el hospital.** Un simple gel de hemoglobina permite diagnosticar una anemia falciforme, y un anticuerpo monoclonal puede cambiar el pronóstico de un cáncer de mama. Lo que habéis visto en estas técnicas no se queda en el laboratorio: está en la base de la práctica médica cotidiana.
- **La evolución de las técnicas: de lo clásico a lo moderno.** Comenzamos con SDS-PAGE, Edman o cristalografía, y hoy contamos con proteómica, bioinformática e inteligencia artificial como AlphaFold. El futuro apunta hacia una medicina personalizada, en la que cada perfil proteico ayudará a decidir diagnósticos y tratamientos. La medicina del mañana se escribirá, literalmente, en el lenguaje de las proteínas.

Todo lo aprendido no es teoría abstracta. Son herramientas que permiten entender la vida, diagnosticar enfermedades y diseñar tratamientos que cambian el destino de los pacientes.

REFERENCIAS

1. Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica médica. 5ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2019.
2. Devlin TM, editor. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 1997.
3. Devlin TM,. Bioquímica. 4ª ed. Madrid: Reverté; 2004.
4. Lehninger. Principios de Bioquímica; D.L Nelson y M.M. Cox. Omega. 7ª ed. 2019.