



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Seminario 2

Técnicas para el estudio de proteínas

Bioquímica y Biología Molecular 1
Grado en Medicina

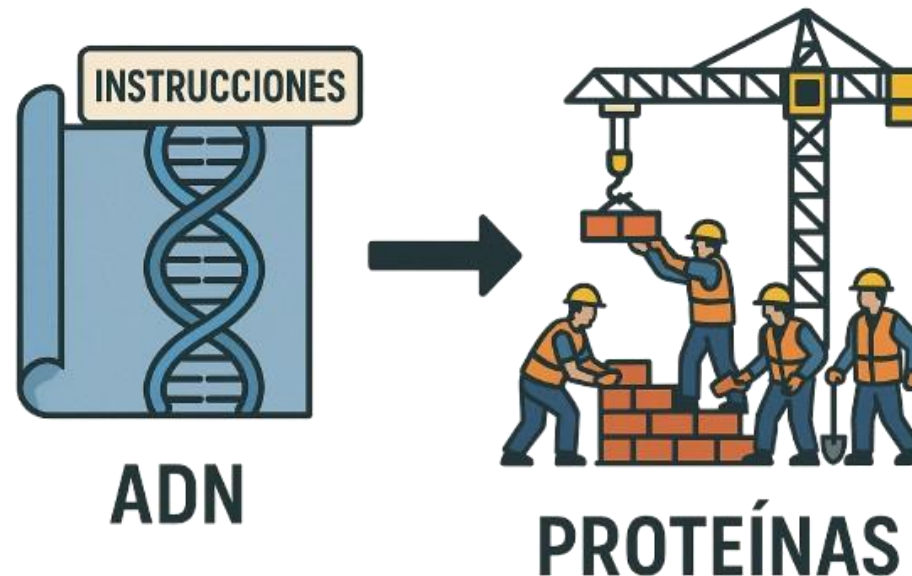
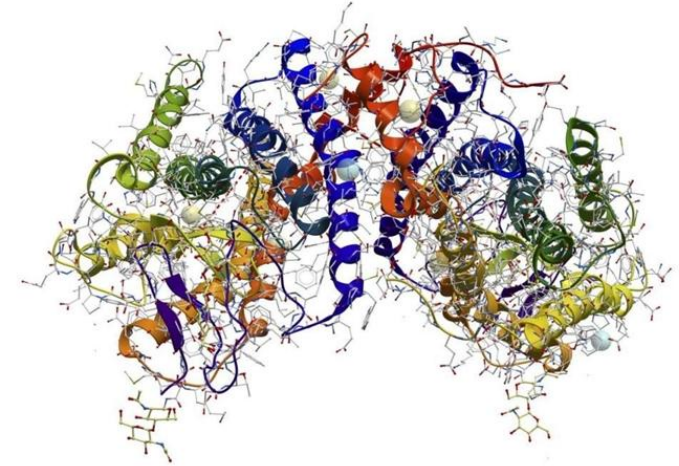
Francisco M. Peinado
peinadofm@uma.es

1. Introducción

2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Concepto de proteínas. ¿Por qué son importantes?

Son biomoléculas orgánicas formadas por una o varias cadenas lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos



1. Introducción

2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Funciones de las proteínas

Catálisis

→ Aceleran reacciones bioquímicas → ALT/AST,CK, lipasa

Defensa

→ Neutralizan patógenos → Anticuerpos

Transporte

→ Mueven moléculas vitales → Hemoglobina

Soporte

→ Dan resistencia mecánica → Colágeno

Movimiento

→ Contracción y transporte celular → Miosina-Actina

Regulación

→ Controlan genes y metabolismo → P-53

Señalización

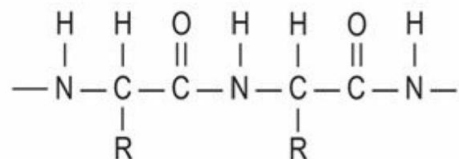
→ Hormonas protéicas transmiten señales → Insulina

1. Introducción

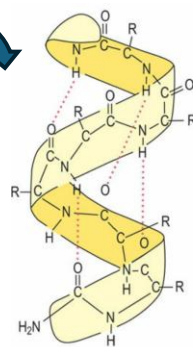
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Estructura de las proteínas

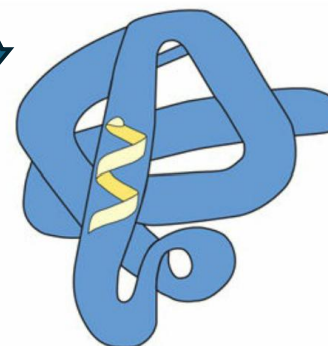
Estructura primaria



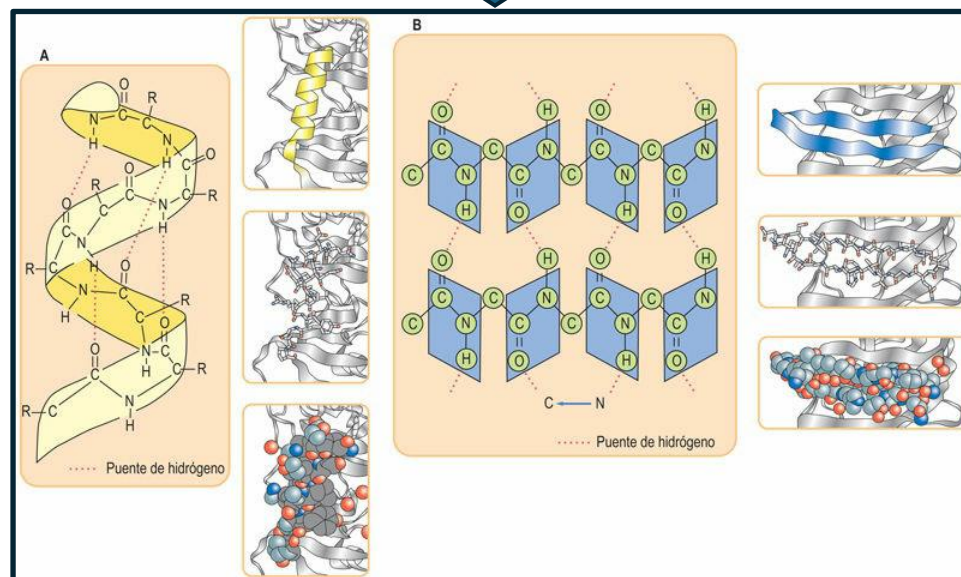
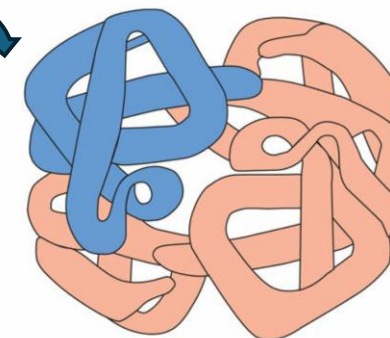
Estructura secundaria



Estructura terciaria



Estructura cuaternaria

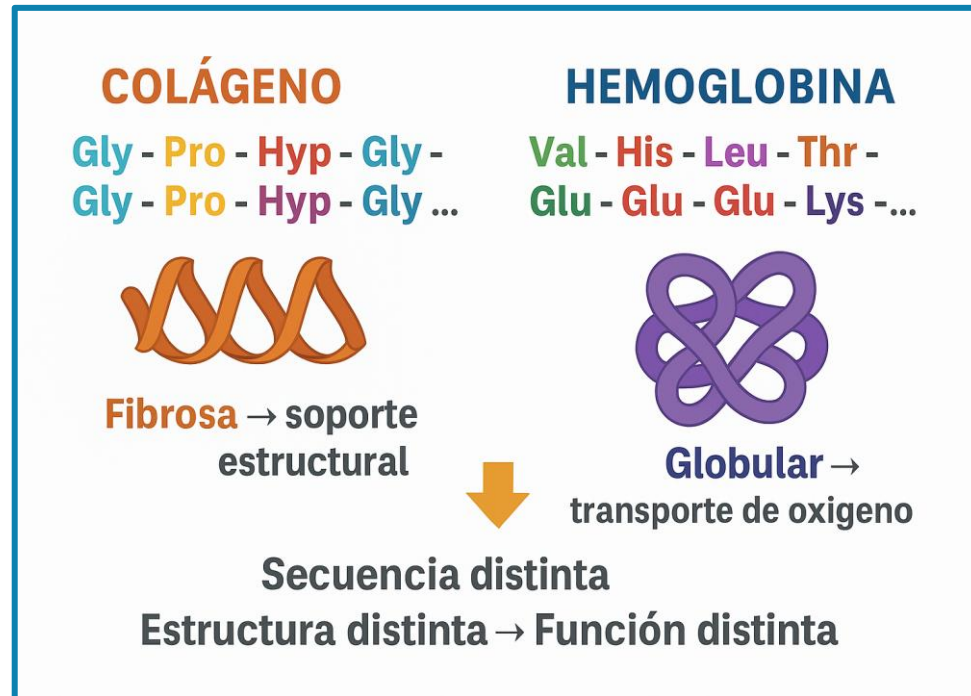


1. Introducción

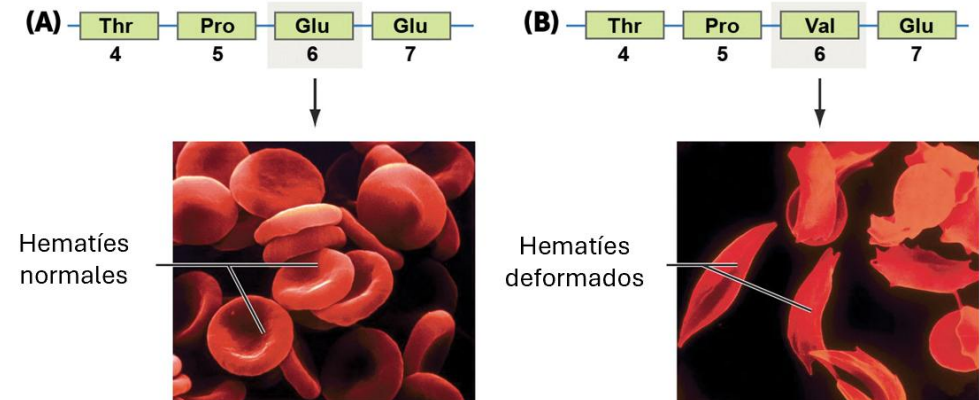
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Relación estructura - actividad

La estructura de la proteína determina la función



Ejemplo: Anemia falciforme



Las proteínas son la base de la vida →

Técnicas de identificación de proteínas

- 1. Introducción
- 2. Purificación de proteínas
- 3. Métodos de separación
- 4. Métodos de purificación
- 5. Técnicas clave en la práctica biomédica
- 6. Problemas habituales durante la purificación
- 7. Evaluación de una purificación
- 8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
- 9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
- 10. Métodos de análisis estructural avanzado
- 11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
- 12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
- 13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
- 14. Terapia génica
- 15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
- 16. Conclusiones

Purificación de proteínas

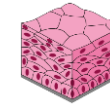
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: es el conjunto de técnicas y procesos utilizados para aislar una proteína específica de una mezcla compleja, con el objetivo de estudiarla o utilizarla.

SELECCIÓN DE LA FUENTE

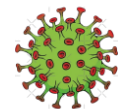
Suero sanguíneo



Tejidos u órganos



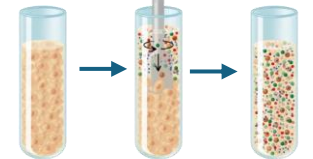
Microorganismos o células recombinantes



PASOS INICIALES

1. Homogeneización (romper el tejido → suspensión celular)

Morteros, disoluciones tampón, homogeneizadores a presión



2. Lisis celular (romper células → liberar proteínas)

Métodos químicos: detergentes

Métodos físicos: sonicación, ciclos congelación/descongelación, presión mecánica



3. Filtración o centrifugación (obtener sobrenadante)



PRECAUCIONES

Mantener bajas temperaturas

Uso de inhibidores de proteasas

pH controlado mediante tampones

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. **Métodos de separación**
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Tipos de centrifugación

Centrifugación convencional

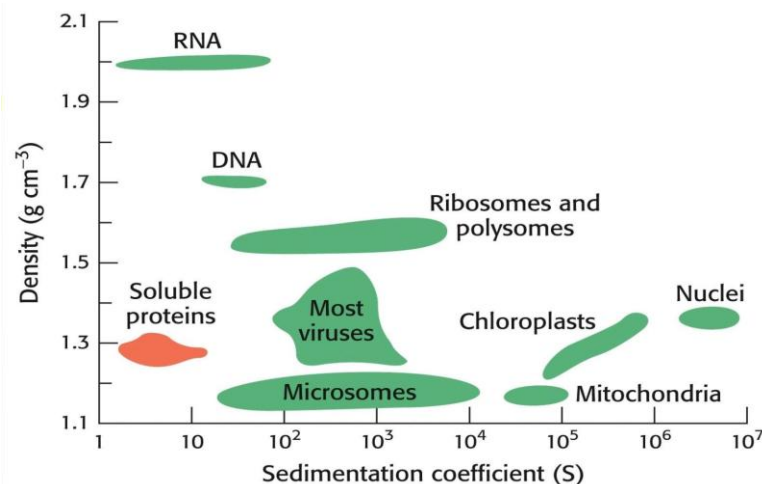
Separa partículas grandes por tamaño y densidad.



Ultracentrifugación

Separa partículas pequeñas por tamaño, densidad y forma con mayor resolución. Hay dos tipos:

- Centrifugación preparativa: para separar componentes celulares o bien obtener precipitados de biomoléculas para su posterior uso.
- Centrifugación analítica: además de separar, se analizan las propias biomoléculas → Diferencias de densidad entre LDL y HDL



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

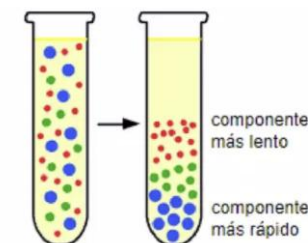
From T. Creighton, *Proteins*, 2nd Edition (W. H. Freeman and Company, 1993), Table 7.1.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. **Métodos de separación**
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

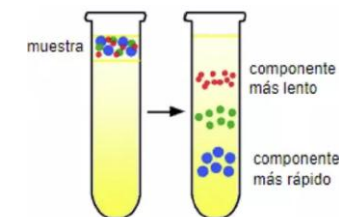
Estrategias de fraccionamiento

Característica	Diferencial	Zonal	Isopícnica
Principio de separación	Tamaño y densidad relativa	Velocidad de sedimentación (tamaño/masa)	Densidad de equilibrio (flotan donde coincide con el gradiente)
Tipo de medio	Medio homogéneo	Gradiente de densidad	Gradiente de densidad
Qué se obtiene	Pellets enriquecidos en orgánulos	Bandas separadas según masa/tamaño	Bandas definidas según densidad
Ejemplos de aplicación	Aislamiento de orgánulos celulares	Separación de virus y orgánulos de distinto tamaño	Lipoproteínas (HDL vs LDL)
Ventajas	Sencilla, rápida, barata	Buena resolución para partículas de distinto tamaño	Alta precisión, separación muy específica
Limitaciones	Baja pureza (contaminación entre fracciones)	Riesgo de que todas las partículas acaben en el fondo si se centrifuga demasiado tiempo	Más costosa, lenta, requiere condiciones muy controladas

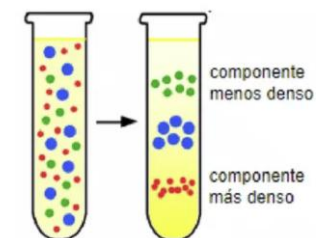
Diferencial



Zonal



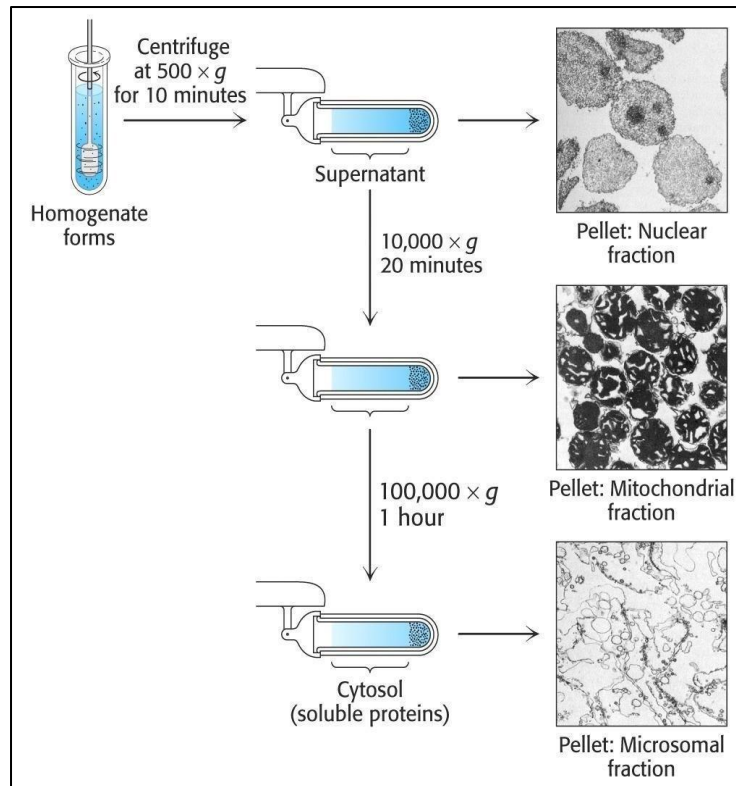
Isopícnica



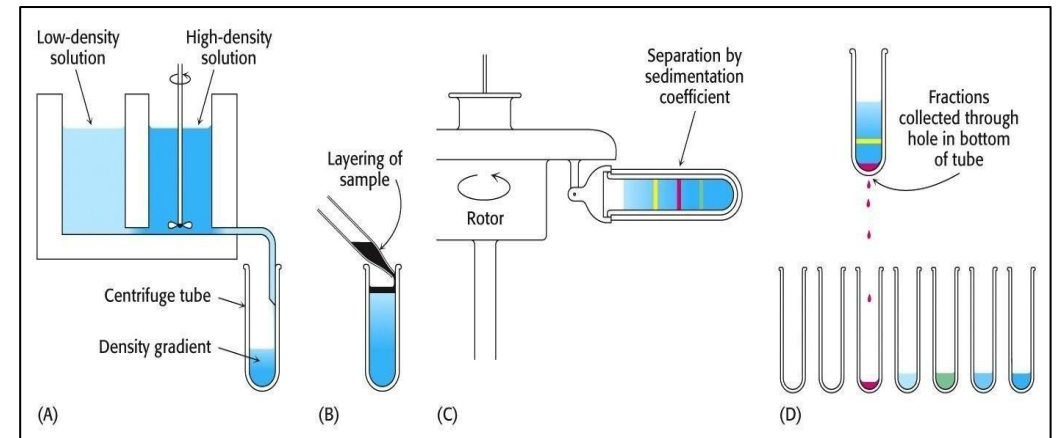
1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. **Métodos de separación**
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Estrategias de fraccionamiento

Centrifugación diferencial



Centrifugación zonal



Purificación según las características de las proteínas

Características	Procedimiento
Solubilidad	<ol style="list-style-type: none">1. Salting in2. Salting out
Carga iónica	<ol style="list-style-type: none">1. Cromatografía de intercambio iónico2. Electroforesis
Polaridad	<ol style="list-style-type: none">1. Cromatografía de adsorción2. Cromatografía en papel3. Cromatografía de fase inversa4. Cromatografía de interacción hidrófoba
Tamaño molecular	<ol style="list-style-type: none">1. Diálisis y ultrafiltración2. Electroforesis en gel3. Cromatografía en filtración en gel4. Ultracentrifugación
Especificidad de unión	<ol style="list-style-type: none">1. Cromatografía de afinidad

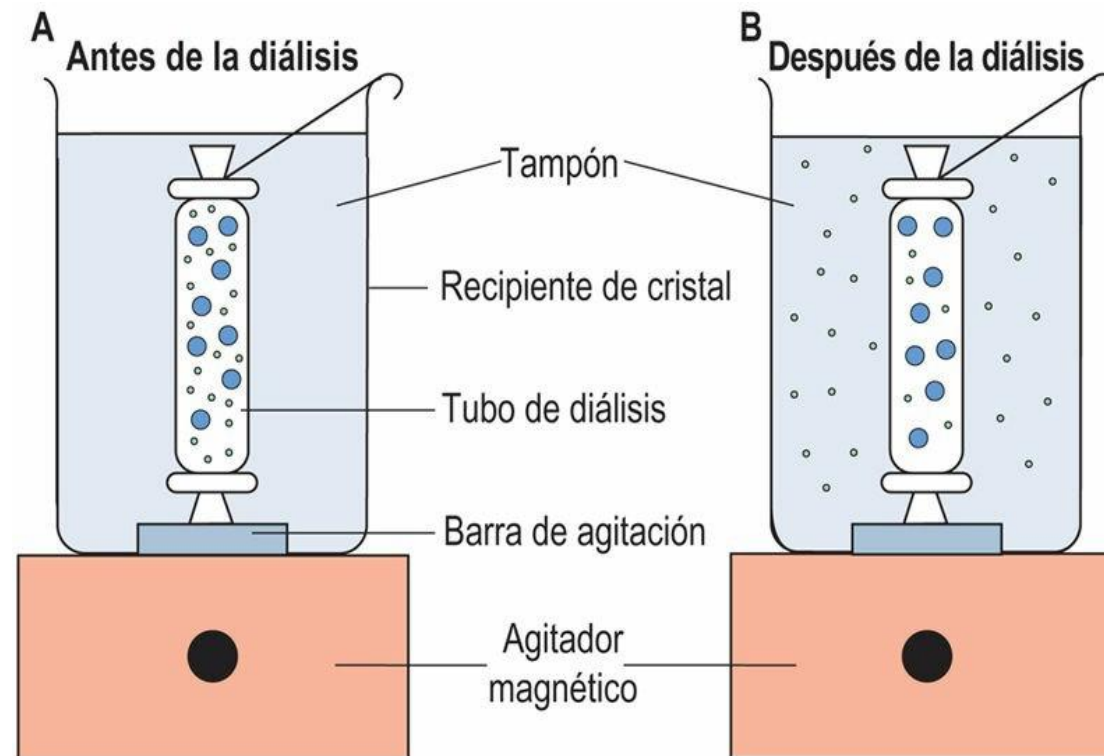
1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. **Métodos de purificación**
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
- 5. Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas clave en la práctica biomédica

DIÁLISIS

Separa proteínas de moléculas pequeñas usando una membrana semipermeable.



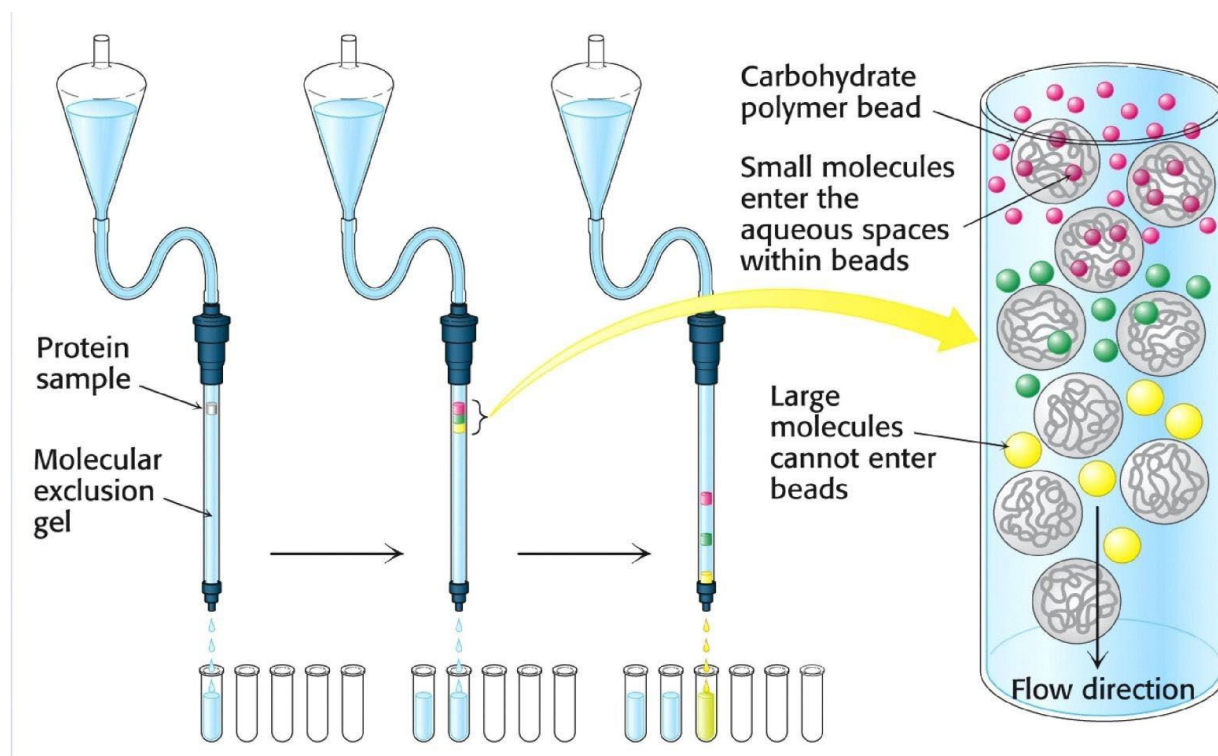
Ejemplo clínico Diálisis



Técnicas clave en la práctica biomédica

CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL (EXCLUSIÓN MOLECULAR)

Separa las proteínas y otras biomoléculas en función de su tamaño.



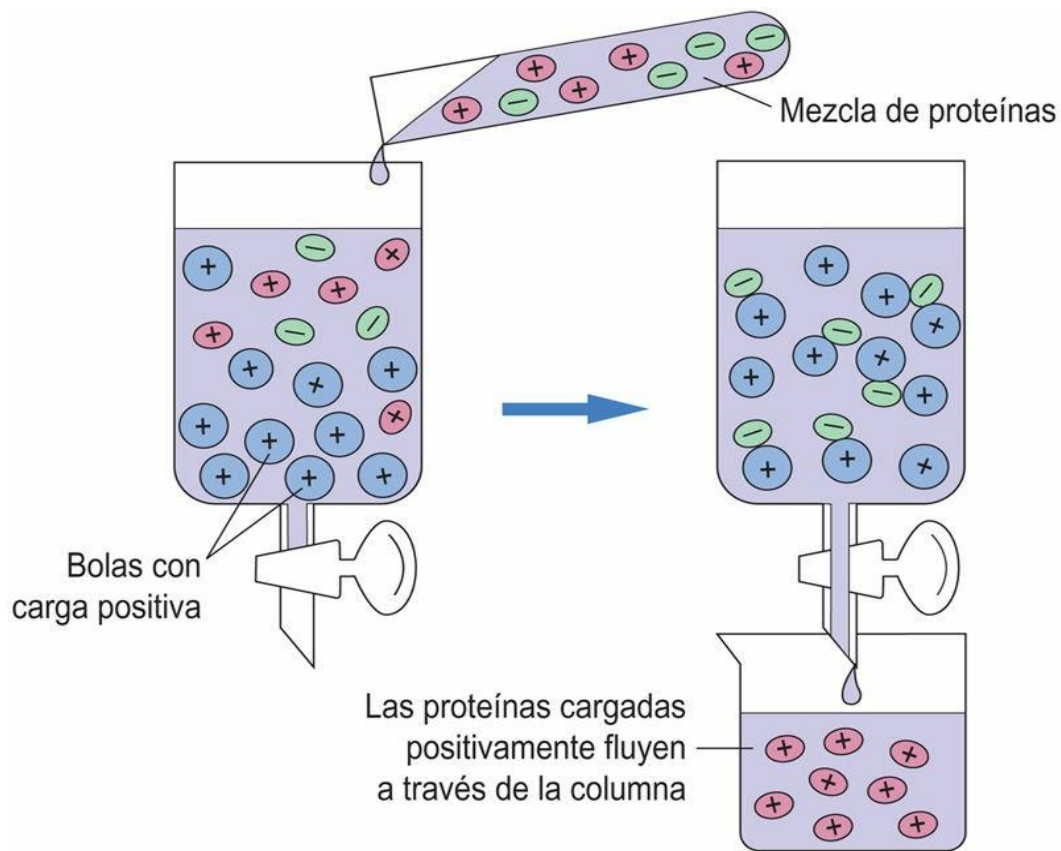
Ejemplo clínico
Detección de proteínas monoclonales en el suero de pacientes con sospecha de mieloma múltiple.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas clave en la práctica biomédica

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Separa las proteínas en función de su carga eléctrica



Ejemplo clínico
Purificación de hemoglobina y sus variantes patológicas (como en la anemia falciforme o las talasemias)

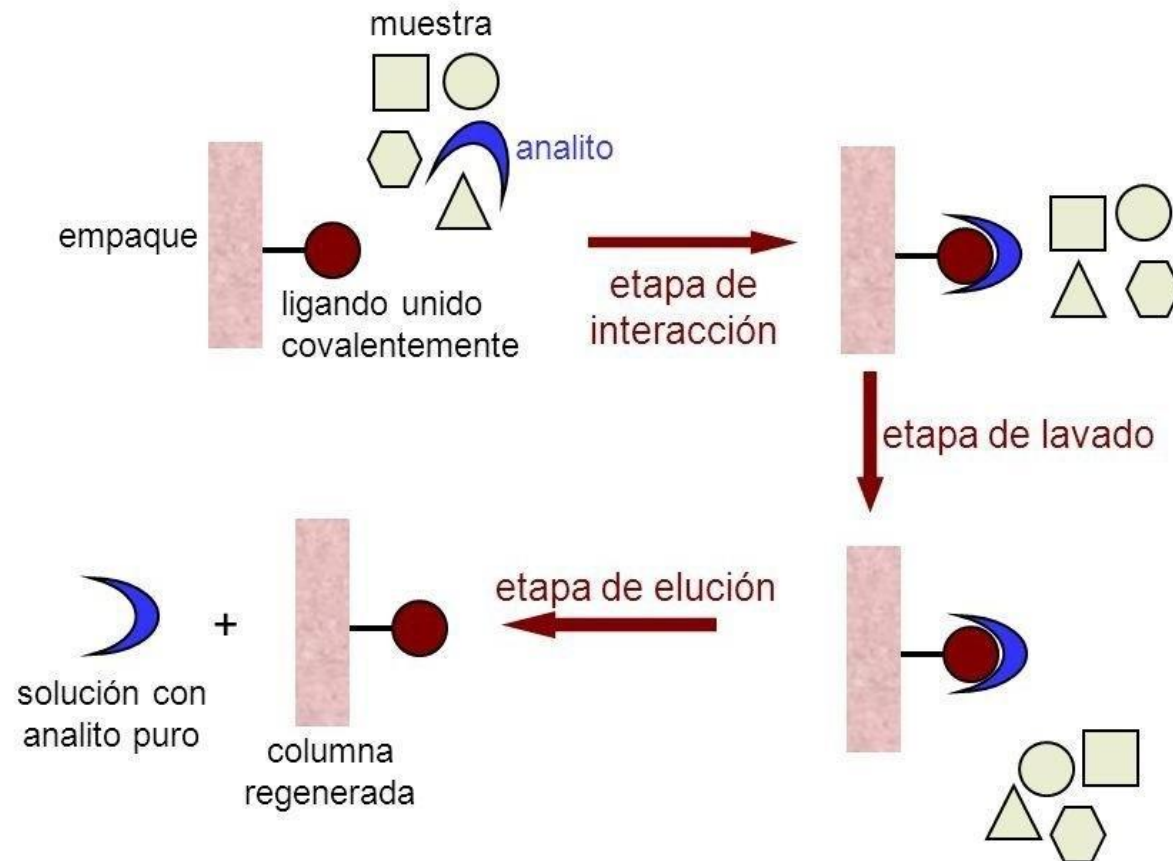
1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas clave en la práctica biomédica

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Separa las proteínas en función de su especificidad de unión



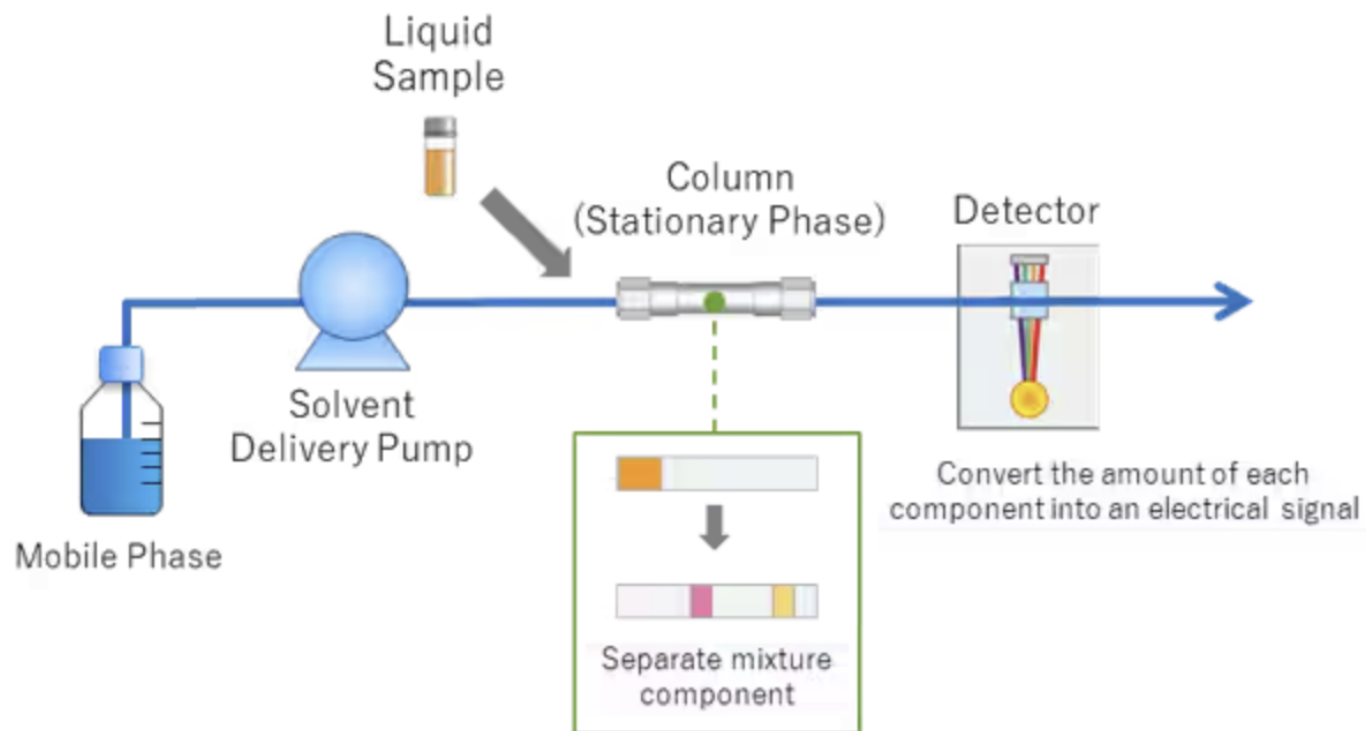
Ejemplo clínico
Purificación de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en el diagnóstico y seguimiento de la diabetes mellitus.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas clave en la práctica biomédica

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Separa compuestos de una mezcla según sus interacciones diferenciales con la fase estacionaria de una columna, permitiendo identificarlos y purificarlos con gran resolución.



Ejemplo clínico
Cuantificación de fármacos inmunosupresores en pacientes trasplantados

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

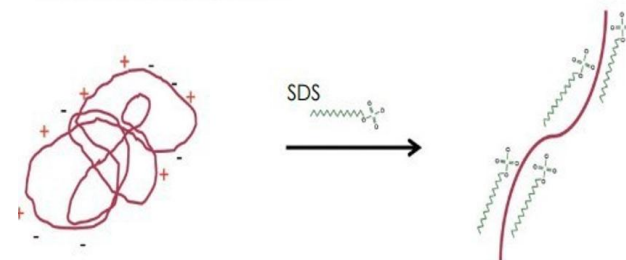
Técnicas clave en la práctica biomédica

ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE)

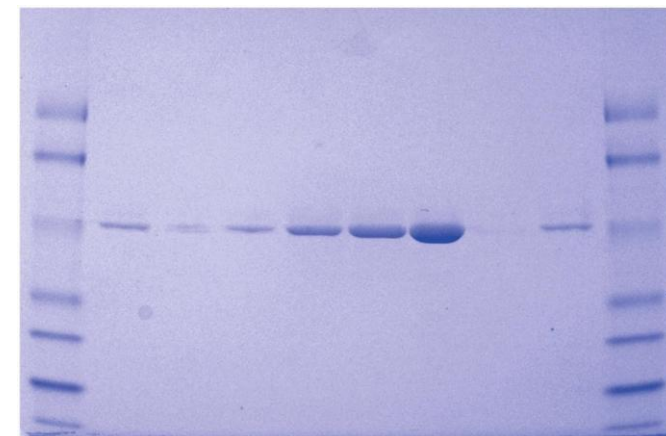
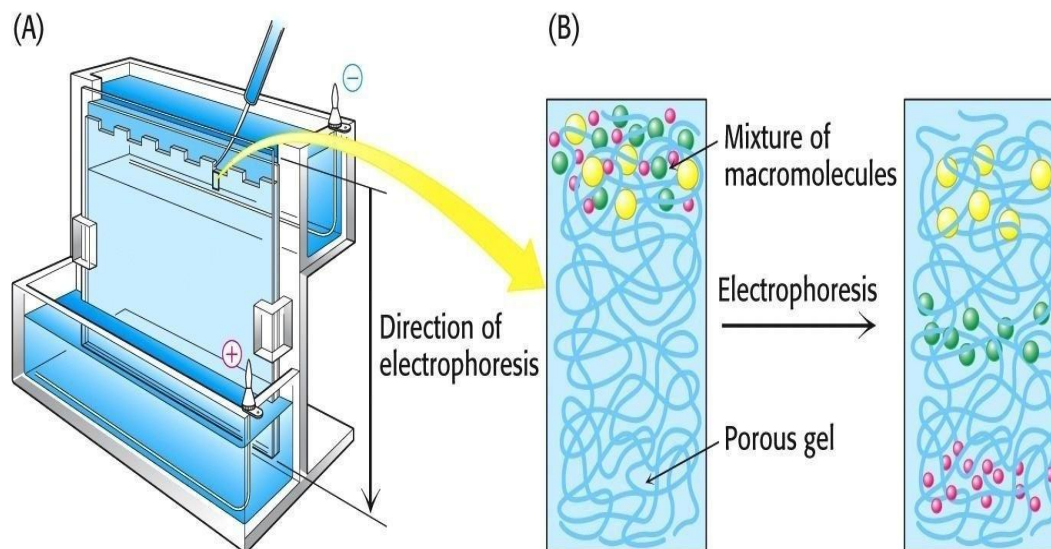
Separa las proteínas de acuerdo a su tamaño molecular

1. ¿De qué está hecho el “camino” por el que correrán las proteínas?
2. ¿Cómo preparamos a las proteínas para que compitan “solo por tamaño”?
3. ¿Cómo es la carrera?

La proteína se encuentra en su estado conformacional, manteniendo su carga intrínseca



El SDS se une a la proteína y da lugar a una linealización y a una uniformidad de la carga negativa de ésta.



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

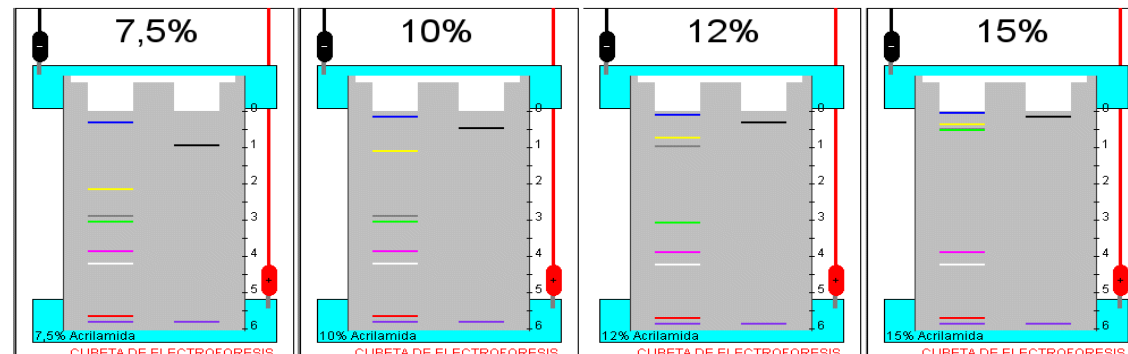
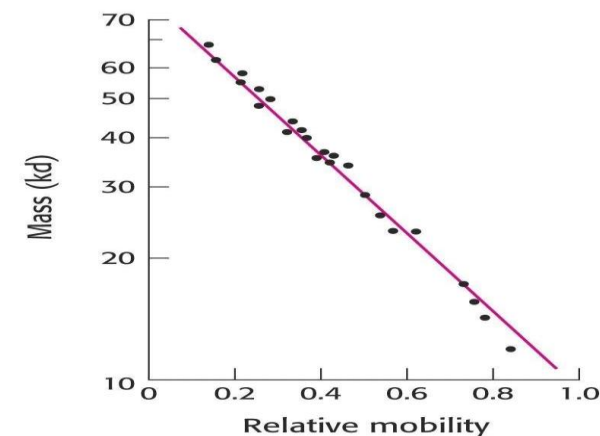
Técnicas clave en la práctica biomédica

ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Separa las proteínas de acuerdo a su tamaño molecular

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

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

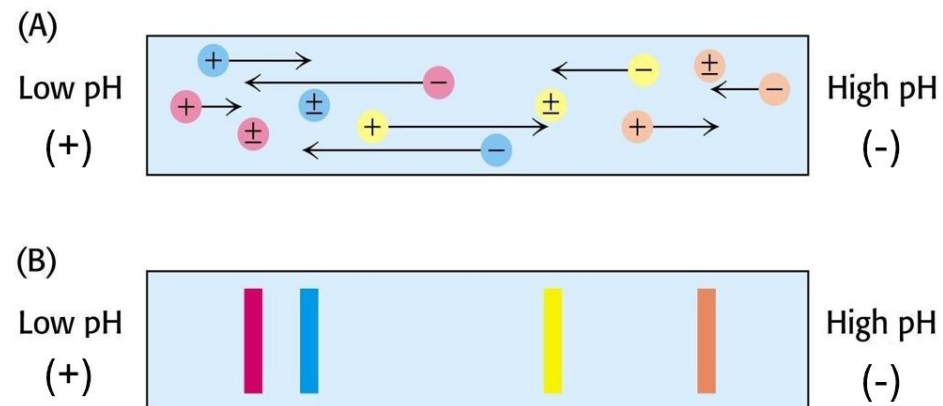
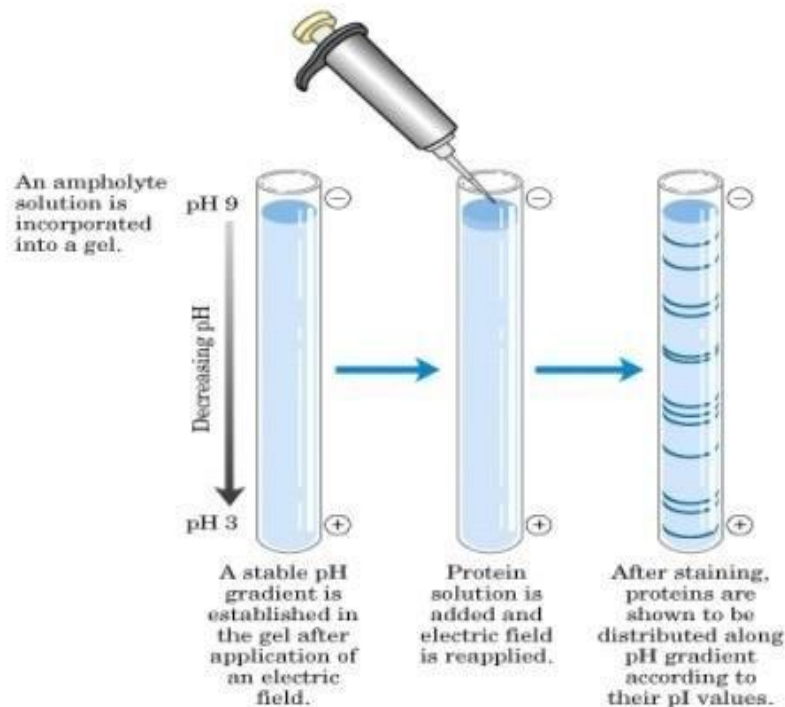


Ejemplo clínico
 Detección de proteinuria de Bence-Jones en pacientes con sospecha de mieloma múltiple.

Técnicas clave en la práctica biomédica

ISOELECTROENFOQUE

Separa las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico



Ejemplo clínico

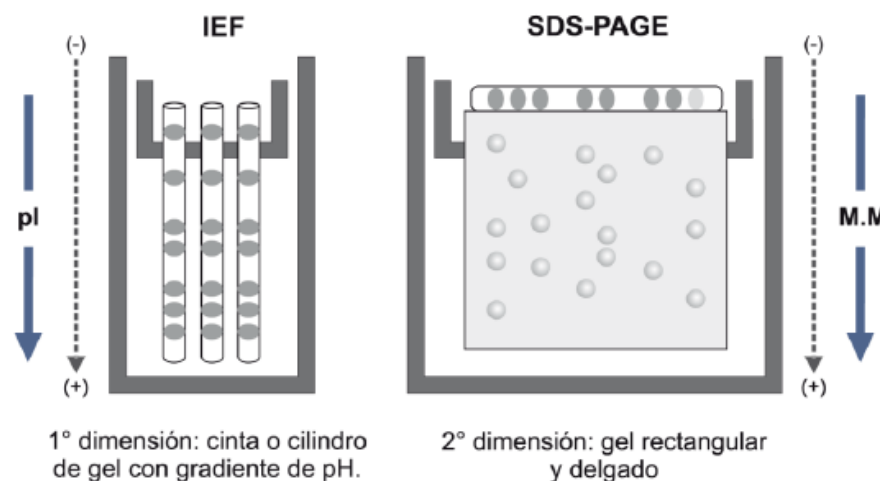
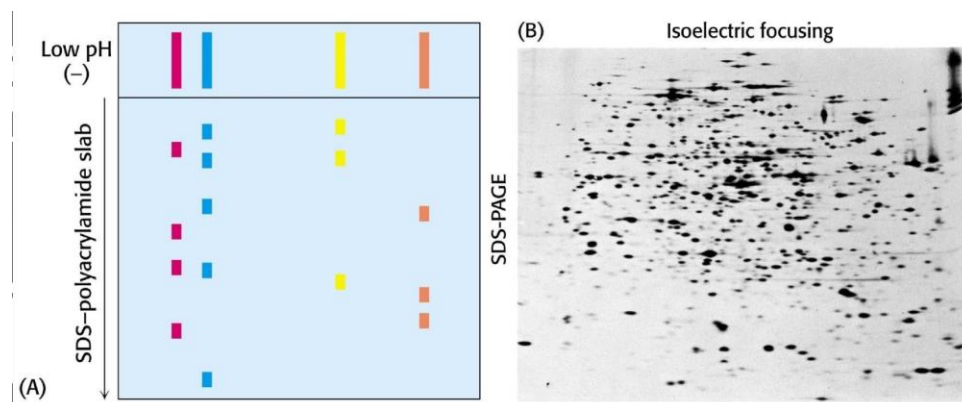
Detección de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con sospecha de esclerosis múltiple

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas clave en la práctica biomédica

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Combina el isoelectroenfoco con el SDS-PAGE para lograr una mayor resolución

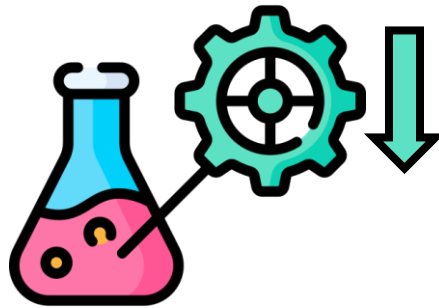


Ejemplo clínico
Estudio del proteoma en el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

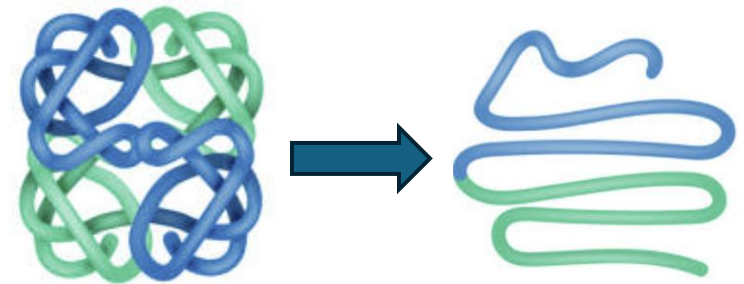
1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. **Técnicas clave en la práctica biomédica**
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Problemas durante la purificación

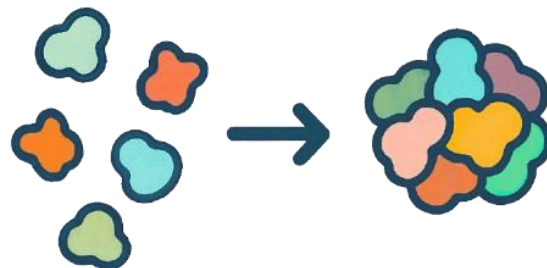
Bajo rendimiento



Inactivación



Agregación



Proteólisis



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
- 6. Problemas habituales durante la purificación**
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

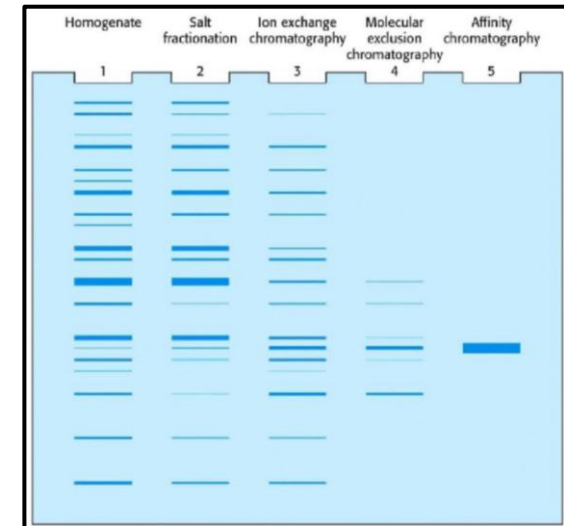
Evaluación de una purificación



Medidas cuantitativas

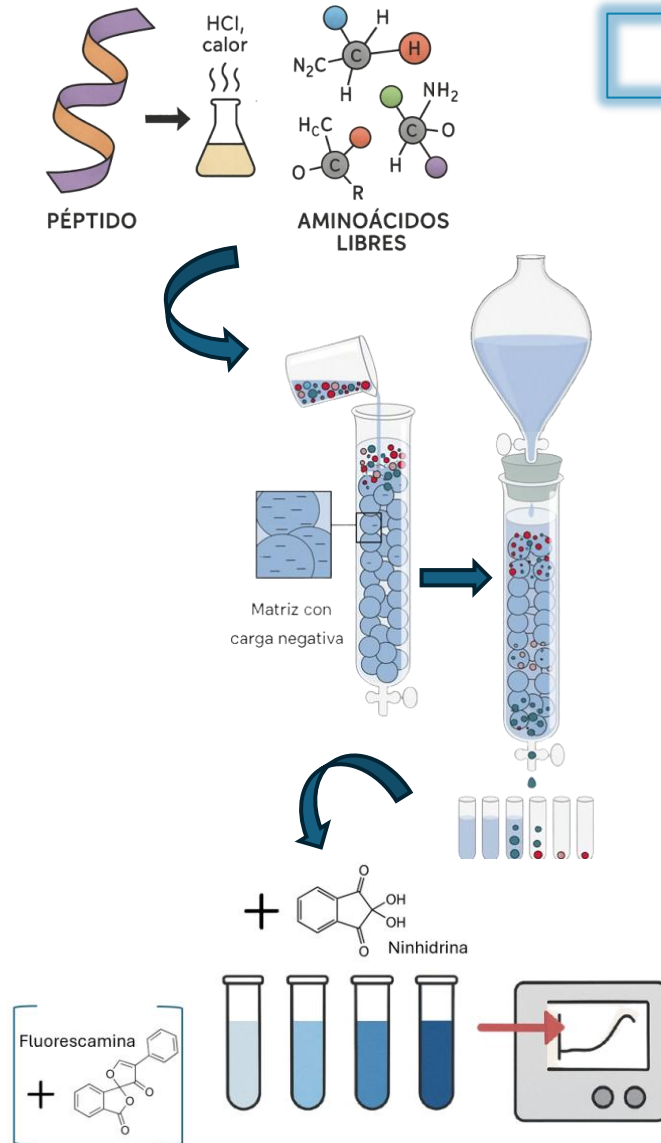
Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity, (units mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification level
Homogenization	15,000	150,000	10	100	1
Salt fractionation	4,600	138,000	30	92	3
Ion-exchange chromatography	1,278	115,500	90	77	9
Molecular exclusion chromatography	68.8	75,000	1,100	50	110
Affinity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

Medidas cuantitativas



Determinación de la estructura primaria

MÉTODO CLÁSICO



1

Hidrólisis de péptidos

2

Separación por intercambio iónico

3

Cuantificación con ninhidrina

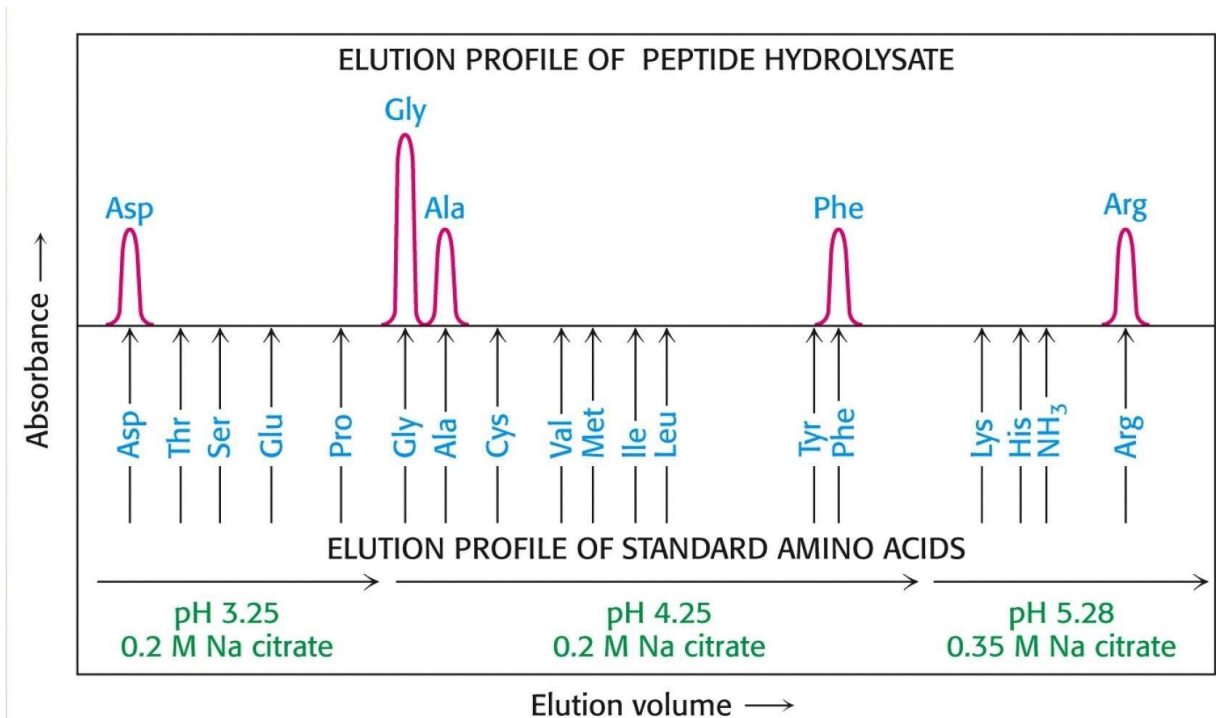
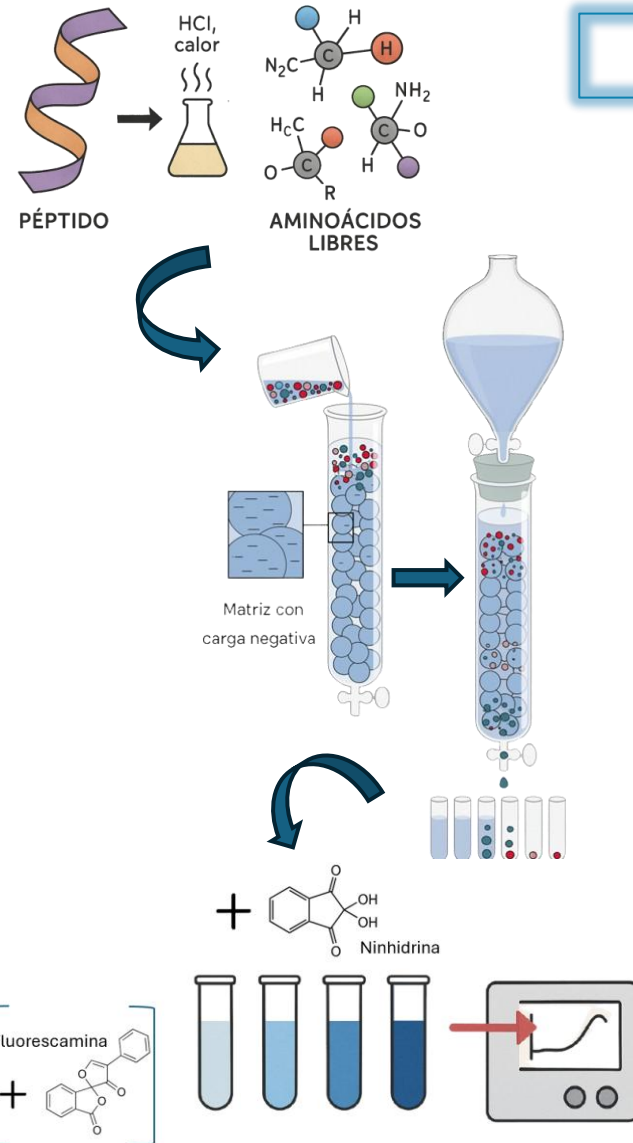
4

Uso de fluorescamina

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. **Determinación de la estructura primaria.**
Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Determinación de la estructura primaria

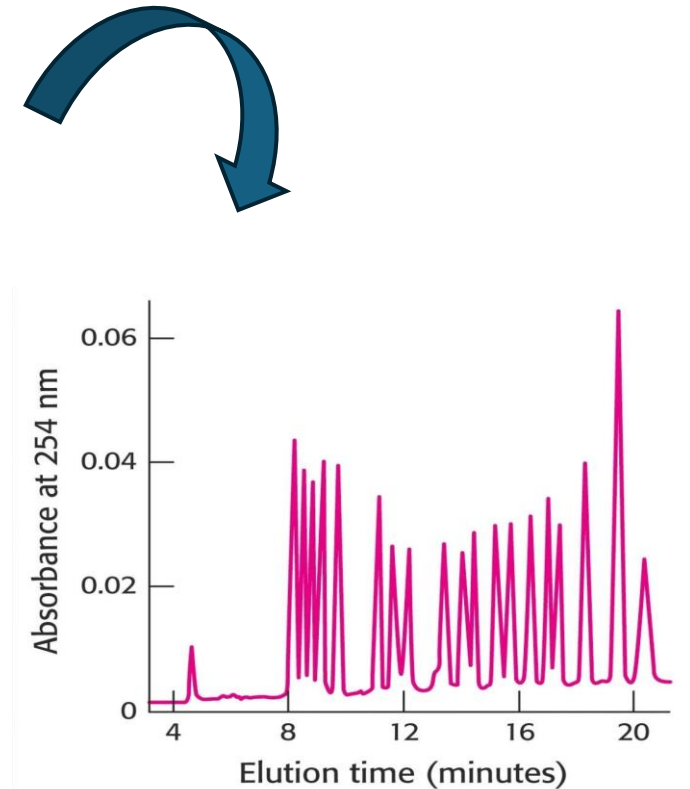
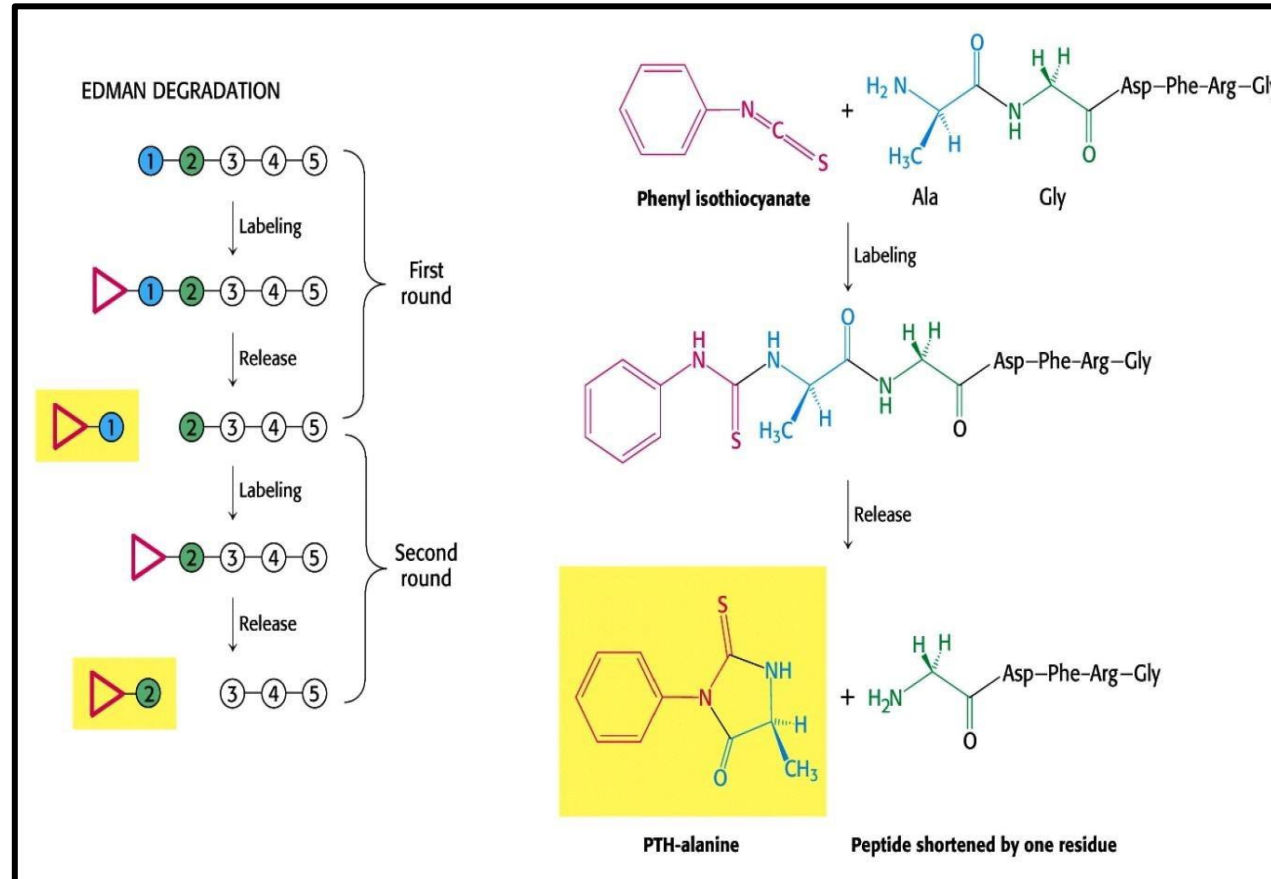
MÉTODO CLÁSICO



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. **Determinación de la estructura primaria.**
Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Determinación de la estructura primaria

DEGRADACIÓN DE EDMAN



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. **Determinación de la estructura primaria.**
Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Determinación de la estructura primaria

FRAGMENTACIÓN Y ENSAMBLAJE DE PROTEÍNAS



Reducción de los puentes disulfuro



DTT o β -mercaptoetanol



Bloqueo de los grupos -SH



yodoacetato



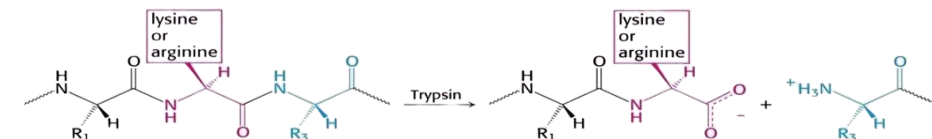
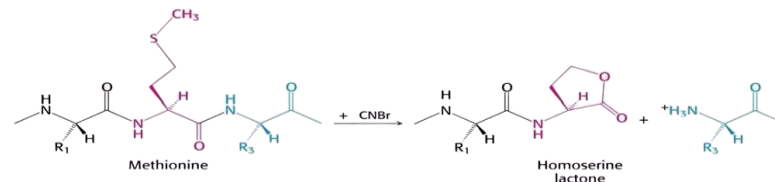
TIJERAS QUÍMICAS

Bromuro de cianógeno (corta específicamente en el lado carboxílico de las metionina)



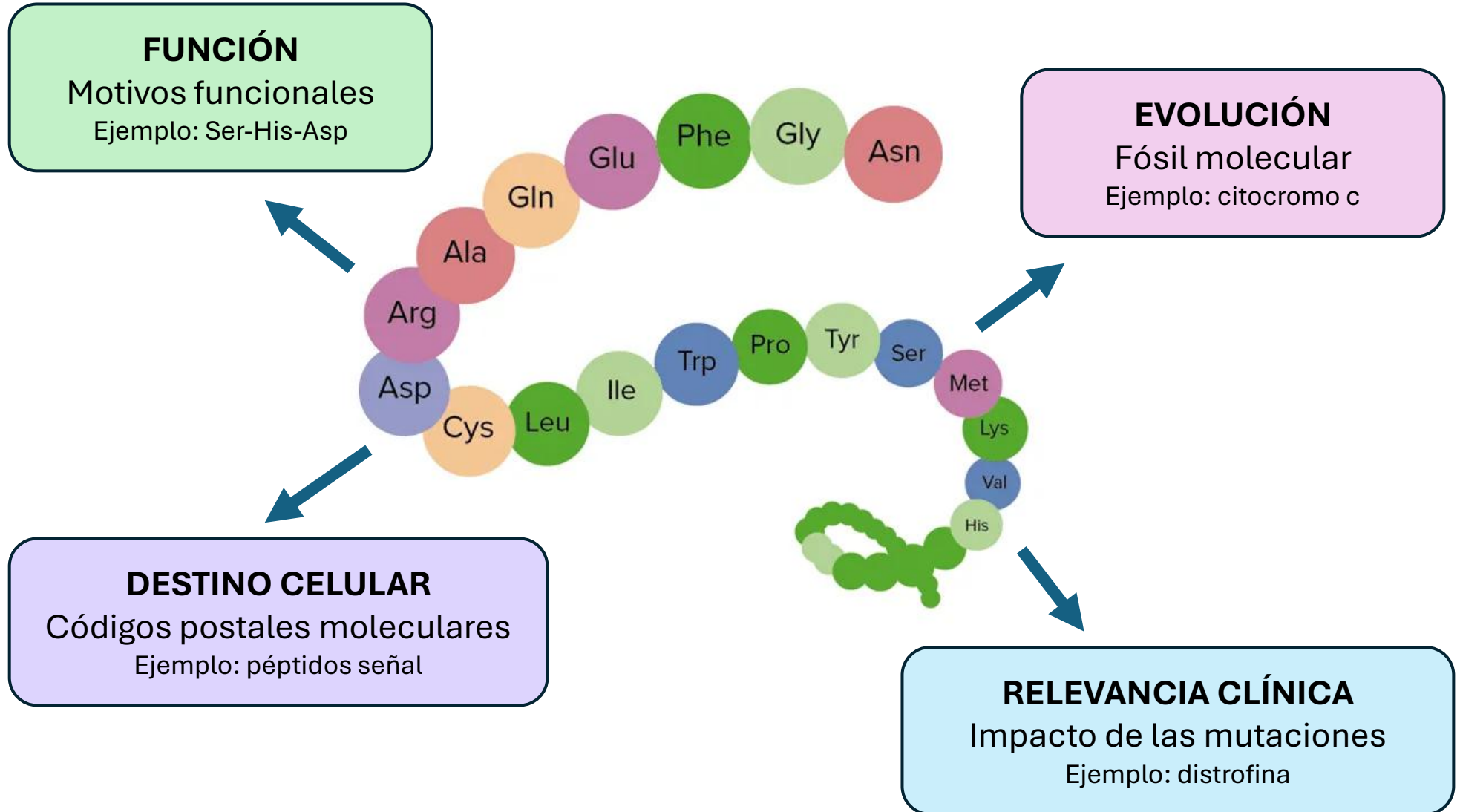
TIJERAS ENZIMÁTICAS

Tripsina (corta tras lisina y arginina)
Quimotripsina (tras aminoácidos aromáticos como tirosina o triptófano)



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. **Determinación de la estructura primaria.**
Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Información que aporta la secuencia de aminoácidos

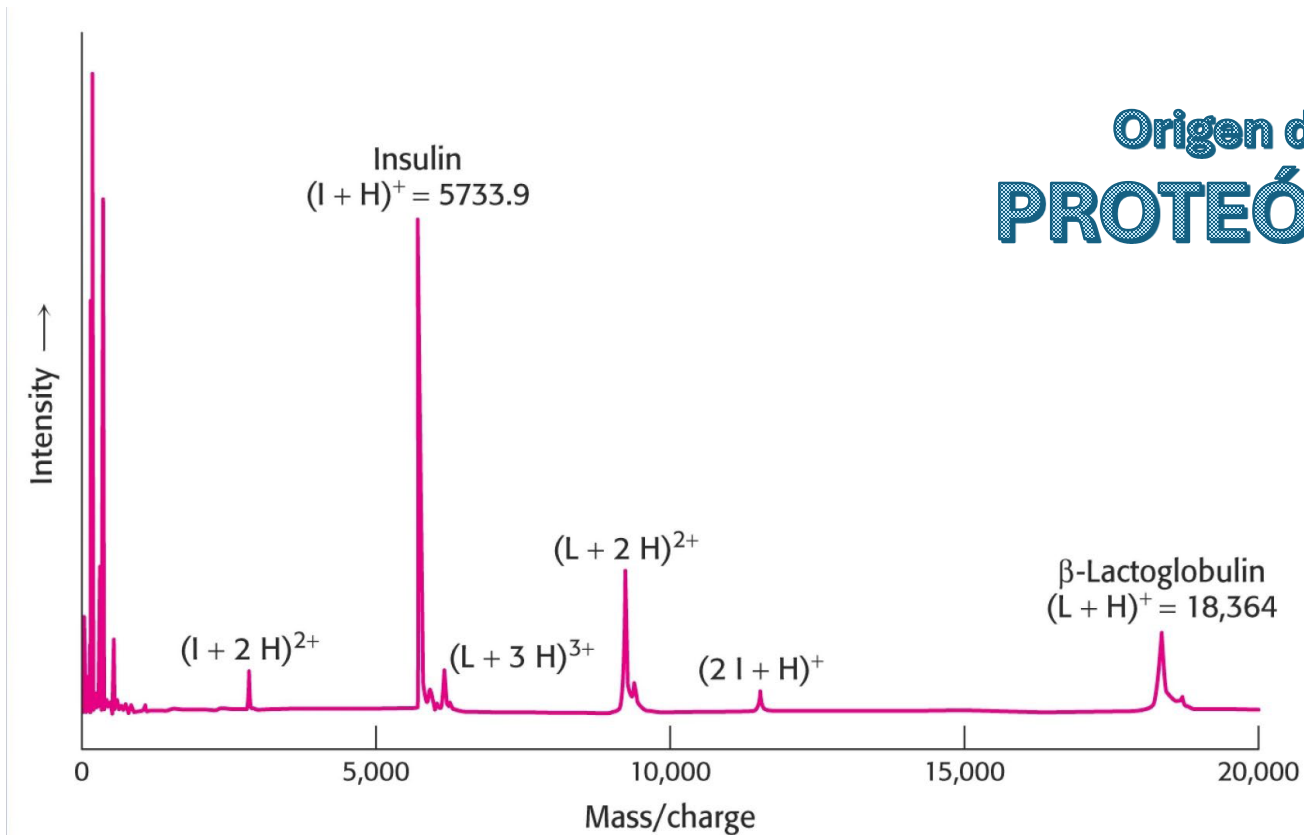


1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
- 9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos**
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Métodos de análisis estructural avanzado

ESPECTOMETRÍA DE MASAS

Identifica y cuantifica moléculas midiendo la relación masa/carga de sus iones



Origen de la
PROTEÓMICA

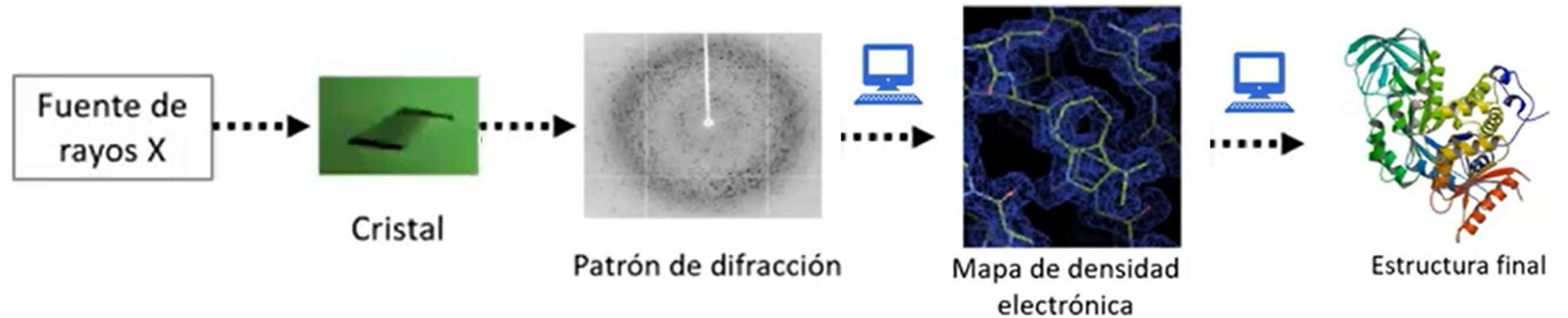
Ejemplo clínico
Detección de errores congénitos del metabolismo mediante el cribado neonatal ampliado.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
- 10. Métodos de análisis estructural avanzado**
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Métodos de análisis estructural avanzado

CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Determina la estructura tridimensional de moléculas analizando cómo un cristal difracta los rayos X



1 **Cristalización**

2 **Difracción**

3 **Reconstrucción**



PREMIO NOBEL, 1962
Hemoglobina

Ejemplo clínico

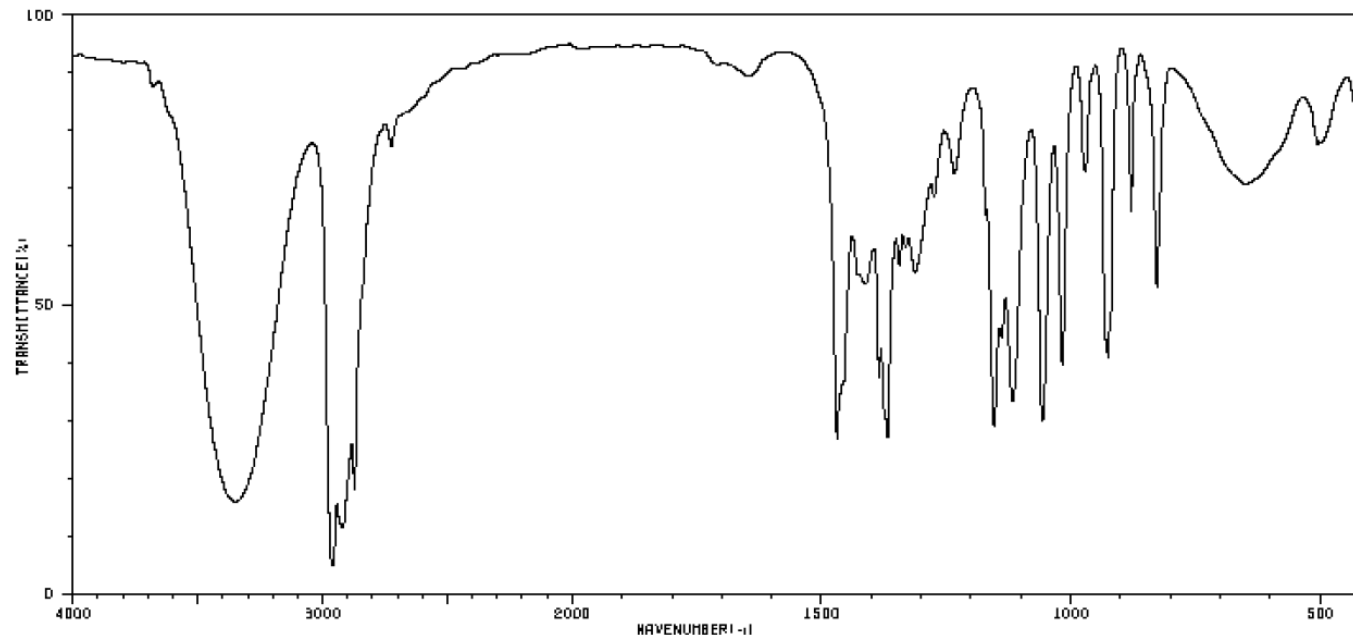
Determinación de la estructura tridimensional de la proteína de la fibrosis quística (CFTR), clave para el desarrollo de terapias dirigidas.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
- 10. Métodos de análisis estructural avanzado**
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Métodos de análisis estructural avanzado

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Revela la estructura y entorno químico de los átomos en una molécula analizando cómo sus núcleos responden a un campo magnético. Permite estudiar las proteínas directamente en disolución, en condiciones más parecidas a las fisiológicas, y observar cómo cambian de conformación.



Ejemplo clínico
Estudio de la beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
- 10. Métodos de análisis estructural avanzado**
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

De la bioinformática a la inteligencia artificial

BIOINFORMÁTICA



INTELIGENCIA ARTIFICIAL



Capaz 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

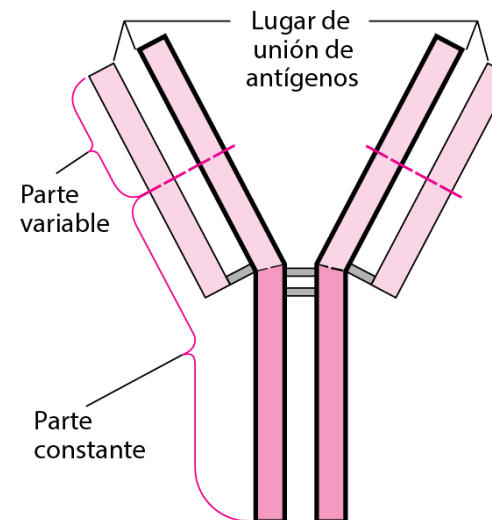
- ✓ Complementa técnicas clásicas y bioinformáticas
- ✓ Acelera el descubrimiento de biomarcadores
- ✓ Acelera el diseño de fármacos
- ✓ Acelera el desarrollo de la medicina de precisión

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
- 11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial**
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

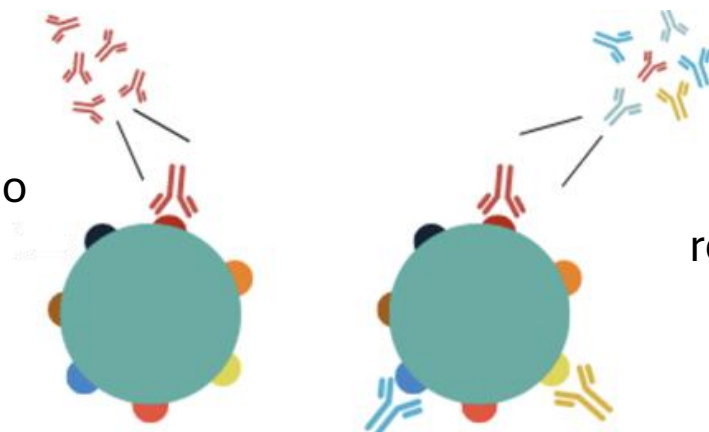
Métodos de análisis funcional e inmunológico

ANTÍGENO: cualquier molécula capaz de inducir una respuesta inmune

ANTICUERPO: proteína producida por los linfocitos B que reconoce con mucha precisión un fragmento específico del antígeno (epítipo). Hay dos tipos:

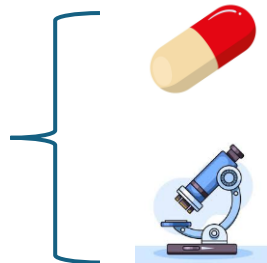


AC. MONOCLONALES: reconocen un único epítipo



AC. POLICLONALES: reconocen múltiples epítipos de un mismo antígeno.

Actualidad



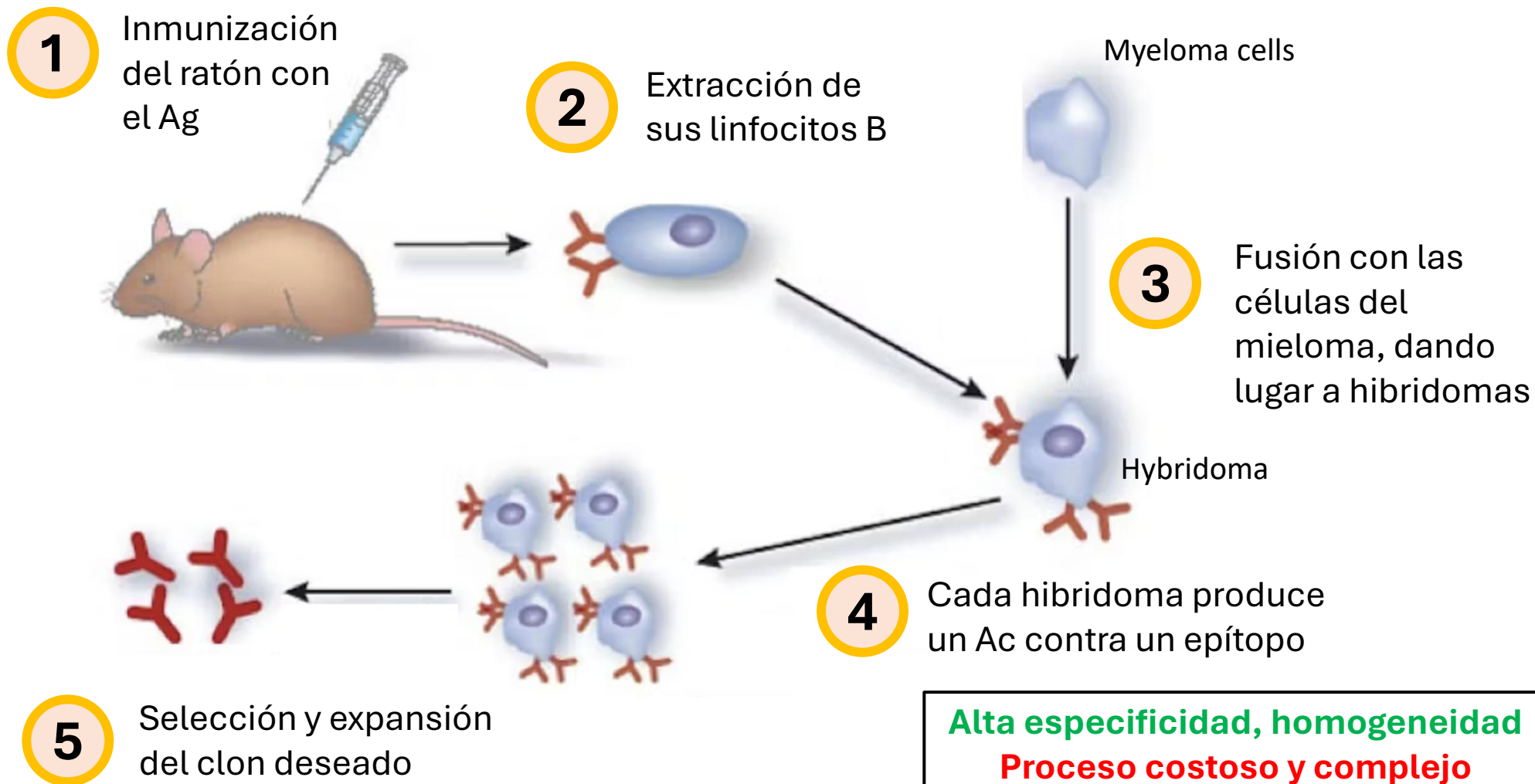
Fármacos de precisión: Rituximab, Trastuzumab

Diagnóstico inmunológico de enfermedades

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Obtención de anticuerpos en el laboratorio

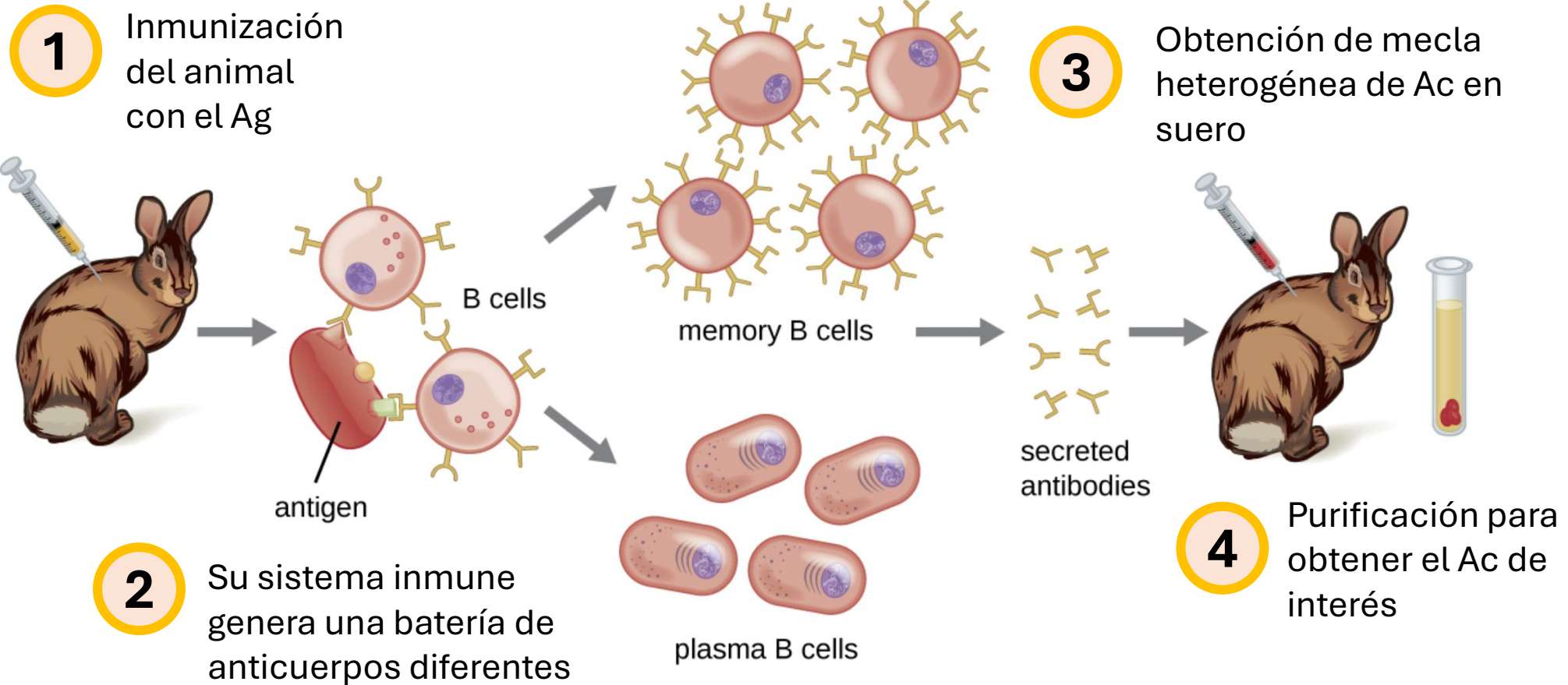
ANTICUERPOS MONOCLONALES



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
- 12. Métodos de análisis funcional e inmunológico**
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Obtención de anticuerpos en el laboratorio

ANTICUERPOS POLICLONALES



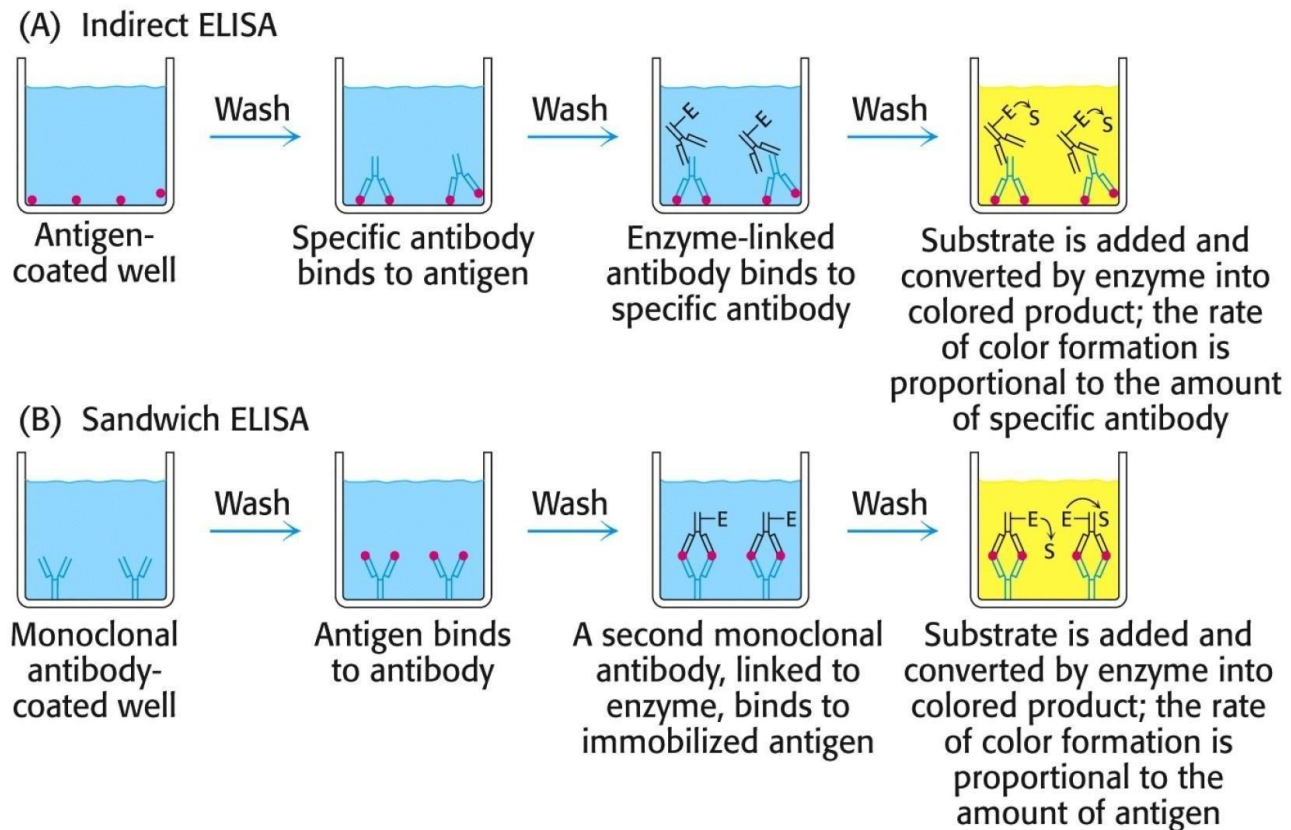
Fáciles y rápidos de producir
Variabilidad entre lotes

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
- 12. Métodos de análisis funcional e inmunológico**
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas de identificación de proteínas a través de Ac

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Detecta y cuantifica moléculas específicas (como proteínas o anticuerpos) mediante la unión antígeno-anticuerpo y una reacción enzimática que genera una señal medible.

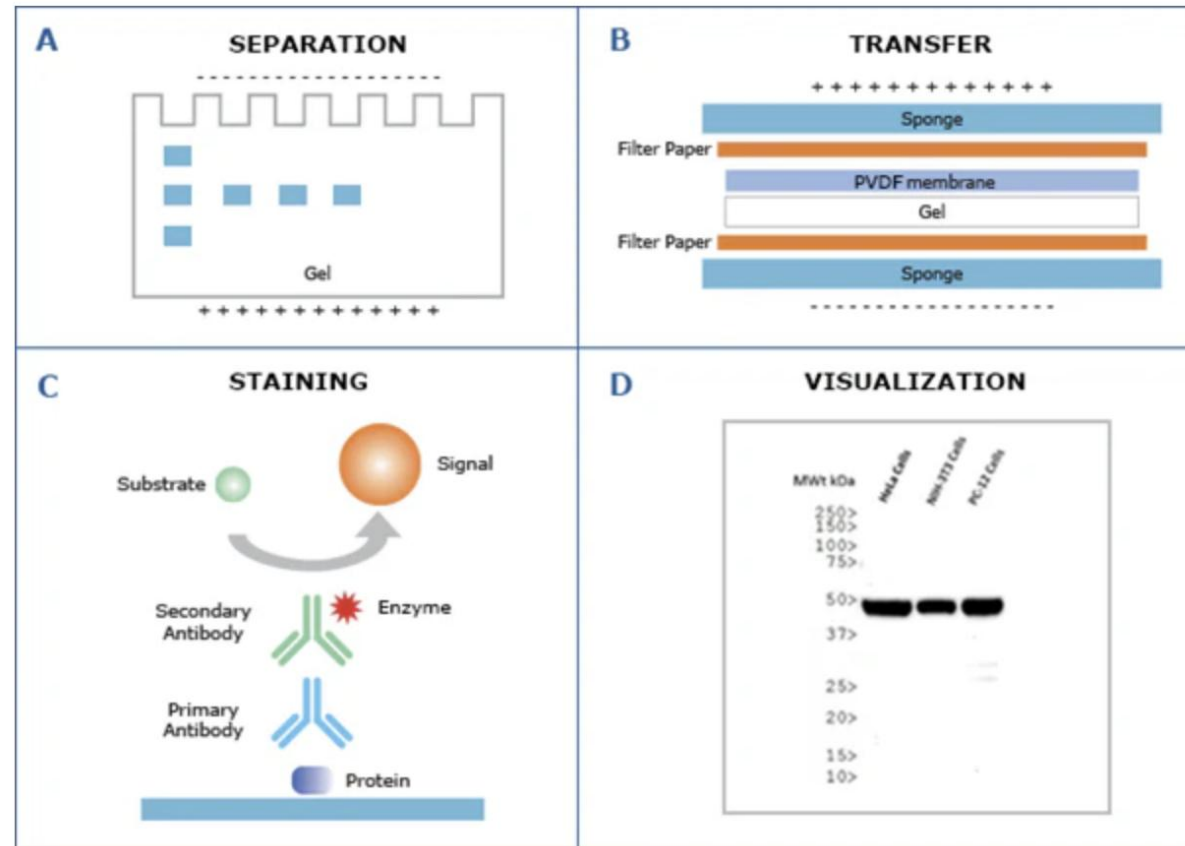


1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
- 12. Métodos de análisis funcional e inmunológico**
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Técnicas de identificación de proteínas a través de Ac

Western blot

Separa proteínas por electroforesis, las transfiere a una membrana y las detecta mediante anticuerpos específicos.



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
- 12. Métodos de análisis funcional e inmunológico**
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
- 12. Métodos de análisis funcional e inmunológico**
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Reacción de comprobación tras la obtención de enzimas

Criterio fundamental → Determinar si la proteína conserva su actividad biológica

¿Cómo?

Realizando un ensayo funcional tras cada proceso de purificación

¿En qué consiste?

En añadir el sustrato específico de la enzima en condiciones controladas y cuantificar la formación del producto

¿Qué se observa?

Si hay una detección de actividad catalítica, la proteína no solo se ha purificado sino que mantiene su función

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.

Síntesis de péptidos en fase sólida

PÉPTIDO SINTÉTICO: pequeña cadena de aminoácidos construida de forma artificial, donde controlamos a voluntad la secuencia

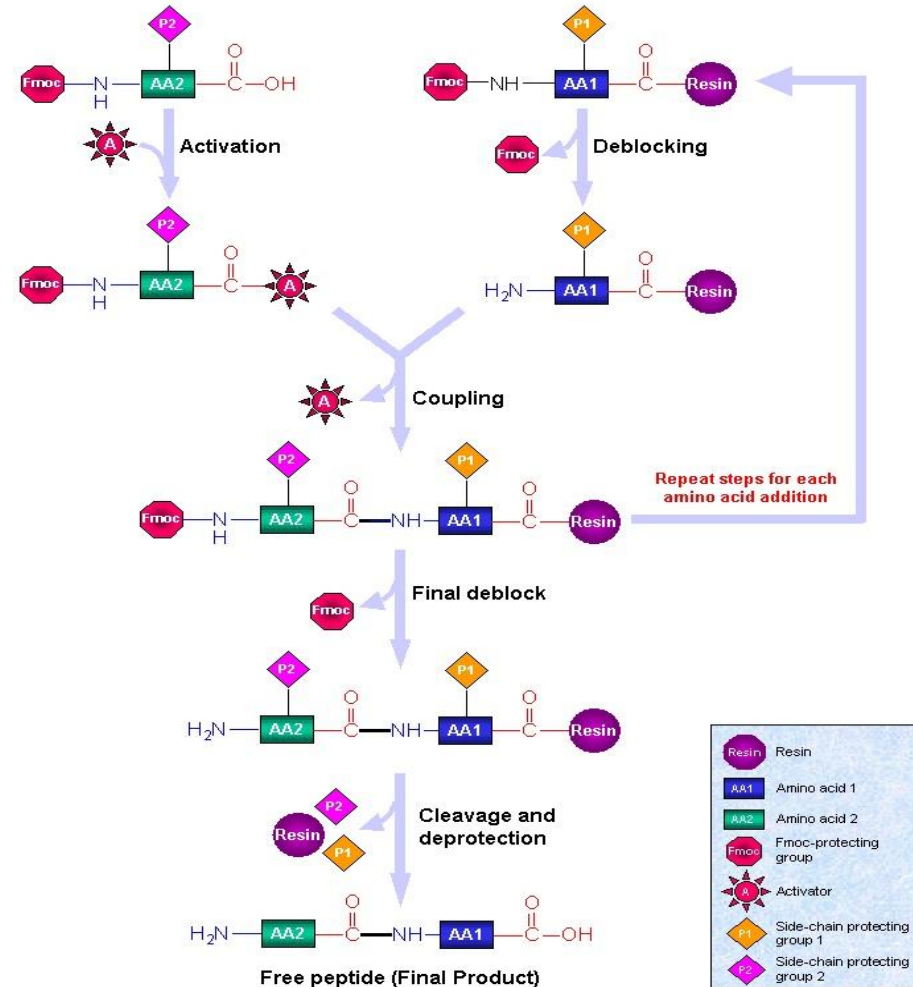
1 Anclaje

2 Desprotección

3 Acoplamiento

4 Repetición

5 Liberación



Grupos protectores: aseguran que solo reacciona un extremo. Por ejemplo: Boc o Fmoc

Reactivo activador: convierte el grupo carboxilo en una forma mucho más reactiva. Por ejemplo: DCC

APLICACIONES

- Producción de Ac
- Vacunas péptidicas frente a virus o tumores.
- Diseño de péptidos antimicrobianos
- Diseño de fármacos

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Terapia génica

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

¿Qué ocurre cuando la célula no fabrica la proteína correcta?

Se devuelven a la célula las instrucciones para que produzca la proteína por sí misma

¿Cómo?

Introduciendo material genético en las células para corregir un defecto o induciendo la síntesis de una proteína terapéutica

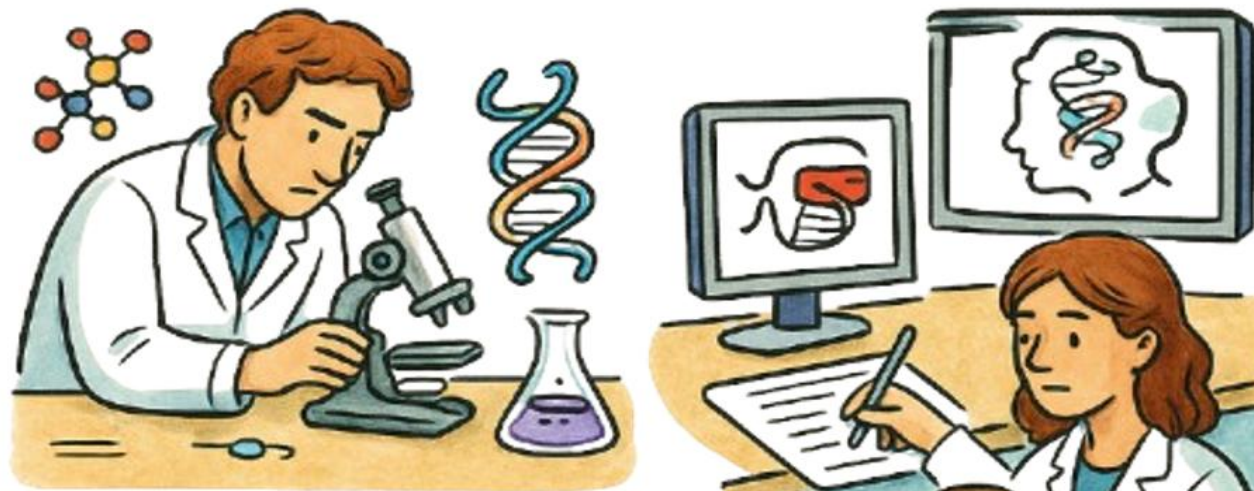
Distrofia muscular de Duchenne → Ausencia de distrofina

TERAPIA GÉNICA: aporta a la célula la capacidad de producir esa proteína



1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
- 14. Terapia génica**
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento
16. Conclusiones

Ciencia translacional

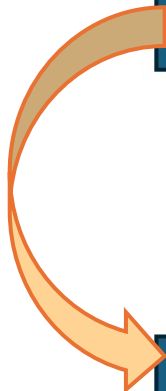


1. LABORATORIO BÁSICO



2. INVESTIGACIÓN CLÍNICA

3. PRÁCTICA HOSPITALARIA

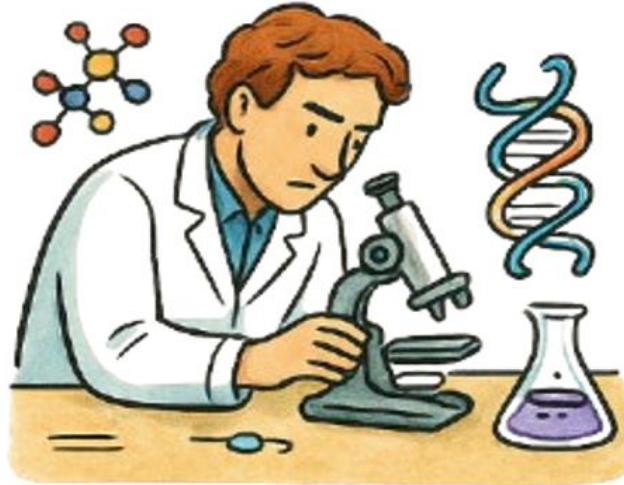


1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
- 15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento**
16. Conclusiones

Ciencia translacional

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
- 15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento**
16. Conclusiones

Se observó que algunas pacientes tenían sobreexpresión de esta proteína de membrana en las células tumorales.



1. LABORATORIO BÁSICO

Se validó como biomarcador, identificando tumores HER2 positivos como más agresivos.



2. INVESTIGACIÓN CLÍNICA



3. PRÁCTICA HOSPITALARIA

Se desarrolló el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin), que bloquea específicamente HER2

HER2 en cáncer de mama

Conclusiones

- Las técnicas son herramientas, no un fin en sí mismas.
- La bioquímica de proteínas es el puente entre el laboratorio y el hospital.
- La evolución de las técnicas: de lo clásico a lo moderno.

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.

1. Introducción
2. Purificación de proteínas
3. Métodos de separación
4. Métodos de purificación
5. Técnicas clave en la práctica biomédica
6. Problemas habituales durante la purificación
7. Evaluación de una purificación
8. Determinación de la estructura primaria. Métodos clásicos
9. Información que aporta la secuencia de aminoácidos
10. Métodos de análisis estructural avanzado
11. Predicción estructural: de la bioinformática a la inteligencia artificial
12. Métodos de análisis funcional e inmunológico
13. Aplicaciones biomédicas y moleculares
14. Terapia génica
15. De la investigación básica al diagnóstico y tratamiento

16. Conclusiones



**Thank
You**