

Difusión del conocimiento aplicativo y tecnológico para el desarrollo de métodos analíticos bioquímicos, como la extracción y purificación de proteínas

Applied and technological knowledge transmission to develop analytical biochemical methods, such as protein extraction and purification

DIANA ALEXANDRA OSPINA RIAÑO

Docente catedrática del Departamento de Ciencias Naturales de la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito.

diana.ospina@escuelaing.edu.co

Recibido: 26/02/2018 Aceptado: 01/04/2018

Disponible en http://www.escuelaing.edu.co/es/publicaciones_revista
<http://revistas.escuelaing.edu.co/index.php/reci>

Resumen

La proposición de nuevos tratamientos, alternativas diagnósticas y herramientas clínicas de última generación se ha soportado en rigurosas técnicas bioquímicas. Una de estas técnicas es la extracción y purificación de proteínas, la cual ha servido para elucidar múltiples mecanismos biológicos y postular diversas conclusiones de interés médico y científico. La rigurosidad de la técnica y sus respectivos subprocesos (aislamiento, extracción, purificación e identificación) permiten la presentación de resultados verificables o reproducibles y que, por lo tanto, representan aportes significativos al avance de la ciencia. La rigurosidad técnica en procesos de conocimiento de base es ideal en la investigación moderna y se deben inculcar en las aulas académicas desde las esferas más básicas del conocimiento.

Palabras claves: proteínas, purificación, aislamiento, metodología, técnica de laboratorio, investigación, bioquímica, biotecnología, bioclínica.

Abstract

The proposal of new treatments, diagnostic alternatives, and cutting-edge clinical tools has been supported by rigorous biochemical techniques. One of these techniques is the extraction and purification of proteins, which has served to elucidate multiple biological mechanisms and postulate various conclusions of medical and scientific interest. The rigor of the technique and its respective subprocesses (isolation, extraction, purification, and identification) allow the presentation of verifiable or reproducible results and that, therefore, represent significant contributions to the advancement of science. The technical rigor in basic knowledge processes is ideal in modern research and should be fostered in academic classrooms from the most basic spheres of knowledge.

Keywords: proteins, purification, isolation, methodology, laboratory technique, research, biochemical, biotechnology, bioclinical.

La sociedad moderna exige desarrollos progresivos, no sólo en áreas de procesos industriales. Es bien sabido que las propuestas investigativas y tecnológicas derivan en desarrollos sólidos y sostenibles. (1) *Ad portas* de cambios significativos en los ámbitos investigativo y académico, se hace necesario entender cómo muchas propuestas investigativas no sólo se orientan a dar solución a procesos industriales. El auge de los procesos biotecnológicos, bioclínicos y biomédicos ha alcanzado grandes avances en otros países (2), donde la aplicabilidad en diversas áreas de la salud y la bioingeniería se ha visibilizado ampliamente, valiéndose de fundamentos básicos de bioquímica para explorar nuevos escenarios prometedores e innovadores. De hecho, la proposición de nuevos tratamientos, alternativas diagnósticas y herramientas clínicas de última generación se ha soportado en rigurosas técnicas bioquímicas (3), con el fin de ser aptas para su publicación en revistas científicas internacionales de alto impacto. Una de las técnicas más exploradas en estas publicaciones científicas es la extracción y purificación de proteínas.

La razón por la cual esta técnica se ha convertido en el procedimiento más versátil del laboratorio es sencilla: las proteínas son moléculas de suma importancia en cualquier organismo, porque son las que cumplen la mayoría de los trabajos dentro de la célula, tales como la estructura, la función y la regulación de tejidos y órganos en el cuerpo (4). Y aunque han permitido develar innumerables empleos biológicos y farmacológicos, es de notar que algunas dudas metodológicas surgen en las aulas e incluso se trasladan a los laboratorios de investigación. Estas dudas que aún se deben resolver son cómo lograr difundir este conocimiento teórico en lo aplicativo y lo práctico, cómo desarrollar en el joven investigador y estudiante capacidades potenciales de interés en dichos métodos analíticos y cómo rescatar de ellos su implicación en la exploración del conocimiento actual.

En muchos trabajos publicados incluso en revistas de alto impacto, la veracidad de los resultados arrojados se pone en tela de juicio cuando se intentan reproducir las técnicas desarrolladas y publicadas (5). La razón es la falta de integración de conocimiento teórico y el ejercicio práctico de laboratorio. Los estudiantes en principio no discernen de qué manera el análisis de lo teórico puede influir en sus diseños experimentales, y es trabajo del investigador asesorarlo y dirigirlo en la integración

de estas variables (6). Por ejemplo, ciertos resultados extraídos de estas técnicas no serían posibles y representarían un fracaso procedimental si ejercicios iniciales y sencillos que provienen de los principios teóricos no se establecen como patrón práctico en cualquier diseño experimental. De hecho, la purificación de proteínas, una de las técnicas ampliamente utilizadas en todo diseño experimental del área bioquímica, puede arrojar resultados desvirtuados por la poca o baja reproducibilidad de éste (7). Y este problema está precisamente relacionado con la evasión de las estrategias básicas en el aislamiento, la extracción o la identificación.

La purificación proteica debe tener en cuenta, en primera instancia, la elección del método correcto para el aislamiento y la extracción de la fuente proteica; esto implica conocer la naturaleza, la procedencia y el comportamiento de la proteína en todos los medios. Si no se conoce de antemano, se pueden cometer diversos errores experimentales que alteren la veracidad de los resultados obtenidos por medio de estas técnicas.

La definición de un ensayo idóneo y esencialmente útil para la identificación de la proteína también es importante, puesto que, si se desconoce el método que favorecerá la determinación correcta, se puede incurrir en la pérdida de muestra obtenida, costos elevados innecesarios en el análisis, sin mencionar la baja capacidad o baja resolución que un método no apropiado puede representar en la identificación. Y, finalmente, centrar la atención en el análisis que permitirá definir qué tan exitoso fue el proceso de extracción y purificación. Es decir, qué tanto se obtuvo de la proteína en cuestión y qué tan pura se encuentra para realizar los respectivos estudios que, publicados o no, tendrán un impacto en la acumulación de conocimiento. La lógica y la consecución de todas estas operaciones representarán una alternativa para ahorrar tiempo en futuras investigaciones del mismo laboratorio o en otros grupos de investigación que hagan trabajos similares, siempre y cuando el método sea preciso y, sobre todo, reproducible.

Existen además diferentes métodos de purificación de proteínas. Uno de los adagios más populares de la bioquímica es nunca desgastar pensamientos puros en proteínas impuras (7). Por eso, hacer uso de los diversos métodos para purificar es el primer paso en cualquier estudio de éstas. Se encuentran, por ejemplo, en la bibliografía desde los métodos más sencillos, por simple fraccionamiento, esto es, modelos que utilizan la sepa-

ración sencilla diferencial (9), hasta las más complejas, que emplean el acople de técnicas analíticas modernas, como la cromatografía o espectrometría de masas. Claro está que para purificar una proteína, como ya se mencionó, es clave extraerla en forma correcta a través de procedimientos que permitan estabilizar la proteína térmicamente y por medio de soluciones tampón que inhiban su destrucción debido a cambios de pH (8). En muchos de estos procedimientos se utilizan inhibidores de proteasas (enzimas que degradan las proteínas).

Una vez que se logre conservar su integridad se purifican mediante métodos de separación, los cuales no son fáciles, pues son procedimientos usados para separar un extracto crudo que puede contener muchos componentes de interés o no. Para ello se utilizan por lo general estrategias de unión antígeno-anticuerpo que favorecen la unión por afinidad de la proteína de interés o la precipitan para separarla de otros componentes de poco interés (9).

Otra estrategia experimental se presenta en las técnicas cromatográficas, que permiten la separación física de los extractos crudos al eluirse sobre una fase estacionaria. Estas técnicas pueden incluir el principio de exclusión molecular, el cual se emplea para separar proteínas de acuerdo con el tamaño de las moléculas. Una segunda opción es el método de afinidad, relacionada con la unión de grupos funcionales que favorecen también la separación de moléculas no afines, y finalmente por intercambio iónico, relacionado con la correspondencia de cargas eléctricas.

Posteriormente, para determinar que en efecto se obtuvo sólo la proteína de interés, debe hacerse un monitoreo que permita confirmar el éxito de la purificación. La estrategia más utilizada para realizar este monitoreo es la electroforesis (8), una técnica que aprovecha la carga eléctrica neta que exhiben las proteínas, pues al someterlas a un campo eléctrico, las proteínas migrarán adicionalmente en función de su peso molecular característico. Algunos de los sistemas electroforéticos más utilizados son las condiciones nativas, a condiciones desnaturizantes o reductoras, o bien la electroforesis bidimensional (10).

Finalmente, se concluye el procedimiento en algunas ocasiones con combinaciones de técnicas más analíticas y automatizadas, que permiten la posterior caracterización de la proteína y, además, determinar la cantidad de proteína extraída y purificada. Estos métodos son muy

exactos, de amplia resolución cuantitativa y cualitativa, y permiten la identificación clara de la proteína de interés (11). De hecho, actualmente se están proponiendo protocolos más versátiles y complejos en los que se hace uso avanzado de métodos moleculares para aislar y purificar proteínas (12).

La práctica de cada uno de los pasos de este proceso previamente descrito representará gran valor procedimental, y la veracidad de los resultados dependerá de un diseño experimental sólido y riguroso. Desconocer alguna de estas técnicas puede generar errores que desfavorezcan o desvirtúen los resultados valiosos obtenidos. Pero ¿cómo difundir este ejercicio metodológico en el laboratorio? ¿Cómo integrar lo teórico en lo aplicativo y práctico? ¿Cómo rescatar de ellos su implicación en investigación?

Lograr que técnicas de este tipo se lleven a cabo correctamente en un laboratorio y que esto se instaure como ejercicio rutinario de un grupo de investigación no siempre es factible, más aún si la realidad de nuestros laboratorios en términos financieros es tan diferente de la de centros de investigación y universidades en otros países (13). En nuestro escenario actual, conseguir los recursos necesarios para suplir a un laboratorio de materiales y reactivos que soporten técnicas bien estandarizadas y diseñadas no es tarea fácil. Y desde ese principio se cometen errores experimentales que pueden impedir el sano desarrollo de trabajos de gran potencial para ser publicados.

Si ya de por sí el escenario no es alentador en términos financieros, por lo menos sí debe hacerse un gran esfuerzo para favorecer el entendimiento práctico y teórico de estas técnicas, metodologías y procedimientos, lo cual implica un esfuerzo no sólo por involucrar la investigación en la academia sino por acercar la ciencia a lo cotidiano y dejar de estigmatizarla como algo inalcanzable. De esta manera, se promueven capacidades de excelencia investigativa en los estudiantes, se fortalecen capacidades prácticas y se incorpora el conocimiento teórico a los ensayos de laboratorio, dándoles fuerza y soporte epistemológico a los resultados obtenidos. De esto se esperarían artículos dignos de revisión internacional y que converjan en trabajos de calidad y de impacto investigativo, lo cual llevaría a generar cadenas de autosostenibilidad del conocimiento.

REFERENCIAS

1. Barbier, E. & Markandya, A. (1990). *Sustainable development economics and environment in the third world*. David Pearce, Londres: Earthscan Ltd.
2. Indicadores del desarrollo mundial (IDM) [internet]. Washington, DC, World Datta Bank, sept 2016. [consulta marzo de 2018], The World Bank Annual Report, 67 páginas, disponible en <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/24985>.
3. Velázquez, R. (2009). *Manual de prácticas de bioquímica clínica*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, pp. 4-6.
4. Biblioteca Nacional de Medicina [internet]. Genetics home reference, Rockville Pike USA, 2018 [consultado marzo 2018], disponible en <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/protein>.
5. McMillan, V. (1996). *Writing Papers in the Biological Sciences*, 5th ed. Boston, New York: Colgate University Statistics Consultant, Robert Arnold Colgate University Library Consultant, Charles F. Priore Jr. Carleton College and St. Olaf College Bedford/ST. Martin's, pp. 71-80.
6. III Congreso Internacional de Nuevas Tendencias en la Formación Permanente del Profesorado. Barcelona, 5, 6 y 7 de septiembre de 2011. Aprendizaje reflexivo y formación permanente.
7. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*, 5th ed. New York: WH Freeman, section 4.1 - Protein Isolation and Purification Information.
8. Voet, D., Voet, J. & Pratt, C. (2007). *Fundamentos de bioquímica*. Madrid: Ed. Médica Panamericana, pp. 105-107.
9. Roca, P., Oliver, J. & Rodríguez, A. (2004). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Palma: Editorial Hélice, Facultad de Ciencias Universidad de las islas Baleares, pp. 217-219.
10. Magdeldin, S., Shymaa, E., Yoshida, Y., Bo Xu, Ying Zhang, Zureena, Z. et al. (2014). Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics* (1): 16. doi: 10.1186/1559-0275-11-16.
11. Urban, P.L. (2016). Quantitative mass spectrometry. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, vol. 374 (doi:10.1098/rsta/374/2079).
12. Eschenfeldt, W.H., Lucy, S., Millard, C.S., Joachimiak, A. & Mark, I.D. (2009). A Family of LIC Vectors for High-Throughput Cloning and Purification of Proteins. In: S.A. Doyle (ed.). *High Throughput Protein Expression and Purification. Methods in Molecular Biology*, vol 498. Humana Press.
13. Unibiblos (2004). *Biotecnología para no biotecnólogos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Dolly Montoya Castaño (ed.), 350 pp.