

# 9

## CAPÍTULO

### **Características generales de las macromoléculas**

Muchas son las características que distinguen a los seres vivos de la materia inanimada y que fueron estudiadas en los capítulos iniciales de este libro. Desde el punto de vista de su composición lo más sobresaliente es la existencia de las macromoléculas, que son organizaciones en las cuales participan cientos o miles de átomos con una compleja distribución tridimensional. Esta extraordinaria complejidad escapa a las concepciones estructurales de la química tradicional, y su estudio es por derecho propio patrimonio exclusivo de la bioquímica.

El desarrollo del conocimiento bioquímico ha marchado paralelo al conocimiento de las macromoléculas y viceversa. En el transcurso de los años, cada vez fue más evidente que los métodos y procedimientos de las químicas general y orgánica eran insuficientes para tratar este problema. Los bioquímicos han tenido que diseñar métodos específicos de análisis de las macromoléculas y, en muchas ocasiones, contribuir directa o indirectamente a la producción de equipos de laboratorio que les permitieran ensanchar la potencia de sus sentidos para penetrar en este complejo campo. Esto trajo como consecuencia que en esa lucha por desentrañar la estructura de las macromoléculas, la bioquímica fuera creando su propio "arsenal" metodológico e instrumental, lo que equivale a decir que se fue haciendo cada vez más una ciencia independiente.

Los primeros resultados exitosos mostraron una realidad más que asombrosa. Las primeras imágenes reconstruidas a partir de los datos experimentales, mostraban unas moléculas de tamaño enorme con plegamientos y replegamientos a cuya organización parecía imposible aplicar lógica alguna; pero los intentos se repitieron, los métodos se ampliaron, los instrumentos se perfeccionaron y cada año se describía, al menos, la estructura tridimensional de un miembro más del grupo. Si los trabajos iniciales implicaron años, los actuales se hacen en meses y tal vez en el futuro se realicen en días. Hoy existe gran colección de conocidas estructuras tridimensionales de macromoléculas, lo cual ha permitido penetrar en los secretos de su estructura o, al menos, en los principios generales que rigen su organización estructural y, a partir de ellos, conocer las formas peculiares de su funcionamiento.

En términos bioquímicos se identifican 3 grandes familias de macromoléculas: las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos. Para su estudio están dedicados los próximos capítulos. En éste se presentarán aquellas características que, en mayor o menor grado, son comunes a todas ellas. Se tratará de presentar aquellas regularidades que subyacen en la organización estructural y hasta donde sea posible funcional de las macromoléculas. Como sucede siempre en la vida, muchas de estas reglas tienen sus excepciones, las cuales en los casos necesarios también serán resaltadas, no como una

muestra más de la biodiversidad al nivel molecular, sino también con el propósito lógico del empleo de la excepción para hacer más valedera la regla.

Estas características generales serán presentadas, acompañadas de algunos procedimientos experimentales que han permitido su comprobación a través de la historia. No en todos los casos se evidenciará cómo el carácter explicado se cumple en todas y cada una de las macromoléculas, pero siempre se hará referencia por lo menos a una de ellas. Algunas de estas características no son tan evidentes en unas macromoléculas como en otras, por tanto, es preferible que en este momento sólo queden enunciadas como generales y que puedan demostrarse después, al estudiar el capítulo correspondiente a cada una de ellas.

## Características generales

Las biomacromoléculas poseen un conjunto de características que son comunes a todas ellas, lo cual permite un estudio sistemático del grupo que debe completarse después con el estudio de las especificidades de cada una; estas características son:

1. Elevado peso molecular.
2. Carácter polimérico.
3. Carácter uniforme.
4. Carácter lineal.
5. Carácter tridimensional.
6. Carácter informacional.
7. Tendencia a la agregación.
8. Relación estructura-función.

Éstas son las que serán estudiadas en este capítulo. Las específicas serán tratadas en los 3 capítulos siguientes.

### Elevado peso molecular

Parece superfluo decir que las macromoléculas tienen elevado peso molecular, es una tautología; sólo escribirlo pretende resaltar este carácter, pues se trata posiblemente del más importante de todos los aspectos que se debe considerar en este tipo de componente molecular de los seres vivos.

La química tradicional estudia moléculas pequeñas, cuyos pesos moleculares alcanzan apenas cientos de unidades de masa atómica y en la mayoría de los casos el volumen molecular es poco importante para el estudio de las propiedades químicas de esos compuestos. La realidad de las macromoléculas es totalmente diferente.

El sistema internacional de medidas establece como unidad de masa atómica el dalton que es equivalente a 1/12 del peso atómico del isótopo más abundante del carbono. Como todas las unidades, ésta admite múltiplos y submúltiplos de los cuales el más utilizado en bioquímica es el kilodalton (kD), que es igual a 1 000 daltons. Mientras los químicos trabajan con sustancias cuyas masas apenas alcanzan 1 kD, los bioquímicos enfrentan el estudio de sustancias con masas de más de 500 kD que son precisamente las macromoléculas. Aunque no existe un límite inferior bien definido, se consideran dentro del grupo de las macromoléculas aquellas sustancias con masas moleculares superiores a los 5 kD. Estos tamaños se manifiestan por propiedades que distinguen a este grupo de sustancias de forma muy especial, las cuales serán estudiadas posteriormente.

## Carácter polimérico

Un polímero es una sustancia que se forma por la unión de varias moléculas más pequeñas, que reciben el nombre de monómeros. Para ambos existe la relación entre el todo y la parte; de ahí que las propiedades del polímero dependen en gran medida del tipo y la cantidad de los monómeros que lo constituye, pero no exclusivamente de eso. En el polímero aparecen propiedades que no pueden deducirse directamente de las propiedades de los monómeros, y que se deben en gran parte a la forma en que estos monómeros están organizados en la formación del polímero. En la estructura del polímero se crean interacciones de atracción o de repulsión que le dan a éste determinadas propiedades que los monómeros por separado no exhiben. Cuando 2 monómeros se unen forman un dímero que en realidad se diferencia poco del monómero, con 3 se forma un trímero que tampoco se diferencia mucho. Pero cuando el cúmulo cuantitativo de monómeros sobrepasa determinado límite aparecen características cualitativas nuevas que son ya las propias del polímero. De todo lo anterior se deduce que las macromoléculas, al poseer carácter polimérico, van a guardar con sus precursores relaciones similares a las descritas y por tanto tendrán propiedades que no pueden explicarse directamente a partir de los monómeros constituyentes, y hace falta conocer la organización estructural del polímero para tener una idea exacta de ellas.

## Carácter uniforme

Todas las biomacromoléculas son polímeros de sus monómeros constituyentes o precursores. Las proteínas son polímeros de aminoácidos, los polisacáridos de monosacáridos y los ácidos nucleicos de nucleótidos. Esta forma de organización les concede carácter uniforme, pues cada biomacromolécula se forma por la polimerización de precursores de la misma clase. Estos precursores se unen mediante una reacción de condensación, con pérdida de una molécula de agua, y quedan enlazados de forma covalente, lo cual le concede fortaleza a la estructura.

Este enlace polimerizante es el más fuerte de todas las interacciones que se establecen entre los monómeros para formar la estructura del polímero, por eso resulta el más difícil de romper. En las proteínas es el enlace peptídico, en los polisacáridos el glicosídico y en los ácidos nucleicos el fosfodiéster.

Estos tipos de enlaces no son particulares de las biomacromoléculas, pues aparecen en otros grupos de compuestos orgánicos, aquí reciben nombres específicos para realzar su importancia; el enlace peptídico es de tipo amida y el glicosídico, un acetálico. La sucesión de estos enlaces y los grupos entre los cuales se forman, determinan la existencia en la macromolécula de un eje covalente principal, que viene a ser algo así como la columna vertebral de su estructura.

Estos enlaces son como ya se dijo de tipo covalente, y tienen al menos 3 propiedades muy importantes para la existencia de las macromoléculas: son fuertes, con una energía de enlace superior a las 50 kcal.mol<sup>-1</sup>; muy estables en agua o disoluciones acuosas, por lo cual las macromoléculas suelen ser muy estables en los organismos vivos cuyo componente mayoritario es el agua, y poseen orientaciones espaciales definidas de acuerdo con el elemento químico de que se trate, por ejemplo en el átomo de carbono con hibridación sp<sup>3</sup>, las valencias están orientadas hacia los vértices de un tetraedro regular.

Las características específicas de estos enlaces y su función en la estructura de las macromoléculas correspondientes serán estudiadas en los capítulos posteriores.

## Carácter lineal

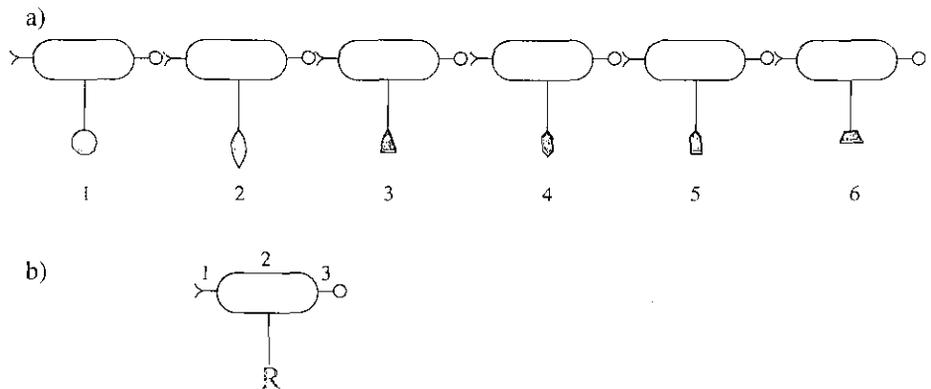
Aun cuando en su estructura existen otras posibilidades, casi siempre las macromoléculas son lineales. En este momento, esta palabra tiene el sentido de carecer

de ramificaciones y no se refiere a la forma de la molécula en el espacio. El carácter lineal se debe a que los monómeros se unen uno a continuación del otro y forman largas cadenas poliméricas sin la existencia de ramificaciones. La única excepción a esta regla aparece entre los polisacáridos, pues algunos tipos de estos compuestos presentan ramificaciones y en ocasiones muy abundantes. Es una ventaja la carencia de ramificaciones en proteínas y ácidos nucleicos, pero también es ventajoso la existencia de ramificaciones en algunos polisacáridos.

La formación del enlace polimerizante ocurre siempre entre 2 grupos bien definidos de la estructura de los precursores; esto hace que todos los precursores que forman parte de la cadena polimérica tengan comprometidos sus 2 grupos de enlace, uno con el precursor que le antecede y otro con el que le sucede, excepto el primero y el último que exhiben libre uno de los 2 grupos. Como estos grupos libres son diferentes en cada extremo, las macromoléculas se caracterizan porque sus extremos no son iguales, lo cual expresa que tienen polaridad. Por lo general los extremos se nombran señalando cuál es el grupo libre.

Esta característica permite definir una dirección en la estructura del polímero, pues permite identificar cuál es el primer precursor y cuál es el último. Cuando 2 cadenas poliméricas del mismo tipo se encuentran acomodadas una al lado de la otra, lo pueden hacer de 2 formas: si el primer precursor de una molécula coincide con el primero de la otra (y por tanto coinciden los 2 últimos) se dice que las cadenas tienen una disposición paralela; en caso contrario se les denomina antiparalelas. Cuando entre 2 macromoléculas existe una relación funcional, de forma tal, que dado un orden para los precursores en una de ellas es posible determinar el orden de los precursores de la otra, se dice que existe colinealidad entre ambas.

Tanto el carácter polimérico, como el uniforme y el lineal se resumen en la figura 9.1.



### Carácter tridimensional

Las macromoléculas presentan una estructura compleja con una organización espacial que se extiende en 3 dimensiones; por supuesto que todos los cuerpos desde los más pequeños son tridimensionales, pero como en los casos anteriores se trata aquí de resaltar esta característica, pues merece especial atención para comprender la estructura y el funcionamiento de estas moléculas. Tal es la complejidad de estas moléculas que para estudiar su organización tridimensional ha sido necesario introducir un sistema de estudios por niveles, que van desde el primario hasta el cuaternario, donde cada uno de ellos expresa un grado diferente de organización estructural. No en todas las macromoléculas estos niveles están perfectamente establecidos y se toman a las proteínas como sistema de referencia para el estudio de todas ellas.

#### Nivel primario

El nivel primario, también llamado estructura primaria, se refiere al orden o sucesión de los monómeros en el polímero. Se origina como consecuencia de la reacción de

Fig. 9.1. El carácter polimérico. En a) se representa un esquema de un polímero formado por precursores de la misma clase, carácter uniforme. La cadena muestra de igual forma su carácter lineal, pues carece de ramificaciones. Como puede observarse el extremo numerado como 1 es diferente del 6, por tanto el polímero posee polaridad. La estructura general del precursor se muestra en b), donde se distingue el óvalo azul (2) que representa una parte de la estructura del precursor, común a todos los de su clase; la zona R representa la parte de la estructura diferente para cada precursor de una clase dada. También en b) se muestran los grupos de enlace identificados con los números 1 y 3. Se puede observar que en a) el precursor número 1 tiene libre el grupo 1, mientras el 6 tiene libre el grupo 3. Se puede afirmar que la molécula tiene polaridad  $1 \rightarrow 3$ .

polimerización y, por tanto, la interacción que lo mantiene es el enlace polimerizante. Ya se dijo que este enlace es el más fuerte de todos los que se forman en las macromoléculas, de lo cual se deduce que el nivel primario es el más estable de todos los niveles estructurales de las macromoléculas.

Teniendo en cuenta las diferencias entre los precursores que integran el polímero, las macromoléculas pueden dividirse en 2 grandes grupos. El primer grupo estaría integrado por aquéllas que están formadas por un solo precursor; recuérdese que el carácter uniforme establece que las macromoléculas están formadas por precursores de la misma clase, por ejemplo, las proteínas por aminoácidos; pero en este caso se trata no del mismo tipo, sino del mismo precursor, o sea, una proteína hipotética que estuviera formada por la polimerización del mismo aminoácido. Este tipo de macromolécula sólo se ha encontrado entre los polisacáridos, por ejemplo, la quitina que forma parte del exoesqueleto de algunos invertebrados, formada por la polimerización de la N-acetil glucosamina; otros ejemplos son el almidón, el glucógeno y la celulosa que están formados sólo por glucosa. En estos casos las moléculas exhiben una monotonía estructural total, pues todos sus sectores son esencialmente iguales.

En otras ocasiones se produce la polimerización de un dímero como se observa en las glicosaminoglicanas, por ejemplo, el ácido hialurónico es un polímero de ácido glucurónico y N-acetil glucosamina, en tanto, el dermatán sulfato resulta de la polimerización del disacárido formado por el ácido L-idurónico y la N-acetil glucosamina-4-sulfato. También en este caso se presenta la monotonía estructural, aunque menos marcada que en el anterior.

Por último, existe la polimerización de trímeros de lo cual el mejor ejemplo es la colágena, formada esencialmente por glicina-prolina-hidroxiprolina que se repite cientos de veces a lo largo de la cadena polimérica. Las macromoléculas de este tipo generalmente cumplen funciones más elementales, como las de servir de soporte estructural a los tejidos o estructuras más complejas y en general (excepto el almidón y el glucógeno) adoptan forma de fibras o filamentos que es la que más se adapta a la función que deben cumplir.

Antes de pasar al otro grupo es bueno señalar que en realidad la monotonía no es total, pues existen pequeñas variaciones en la estructura aunque la mencionada es la predominante en casi el 90 % de la longitud del polímero.

El segundo grupo lo integran aquellas macromoléculas que no poseen un patrón regular de polimerización y en ellas sus precursores se alternan sin que exista ninguna ley que pueda predecir la posición de cada uno, por ejemplo, en el caso del ácido hialurónico, si se sabe que la posición «n» está ocupada por la N-acetil glucosamina, inmediatamente se deduce que la «n+1» será el ácido glucurónico. En las macromoléculas del segundo grupo, saber que un precursor ocupa la posición «n» no permite conocer el «n+1», ya que puede ser cualquiera de los otros. A este grupo pertenece la mayoría de las macromoléculas (Fig. 9.2).

En las macromoléculas se puede distinguir una zona compuesta por los elementos que integran el enlace, que como es siempre el mismo, por el carácter

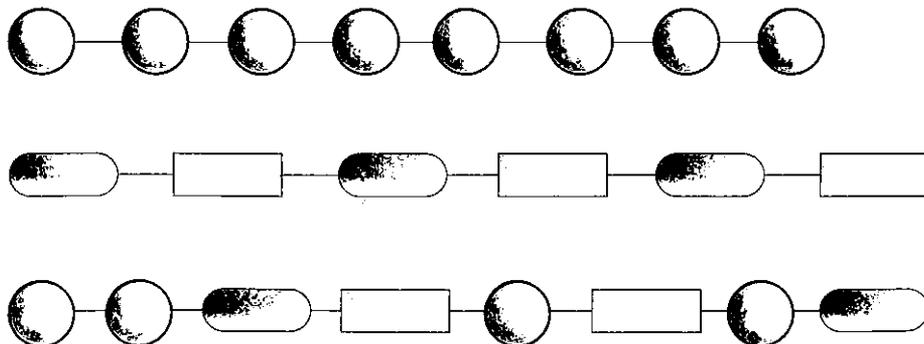


Fig. 9.2. Tipos de polímeros por la composición de precursores. La línea superior muestra un sector de un polímero formado por el mismo precursor, lo cual da al polímero una monotonía total. La línea central presenta un polímero también monótono pero con la combinación de 2 precursores. La línea inferior presenta un polímero totalmente diverso. Obsérvese que no existe regularidad alguna, después del precursor representado por el círculo azul se puede encontrar cualquiera de los precursores, el mismo azul, el verde o el rojo.

uniforme, genera una zona de monotonía estructural. Pero a la par existe una zona que varía en cada punto de la cadena debido a las características estructurales del precursor que esté presente en ese punto; así se genera una zona de variabilidad. Esto significa que en la estructura de las macromoléculas se da la unión de lo monótono y lo diverso (Fig. 9.3).

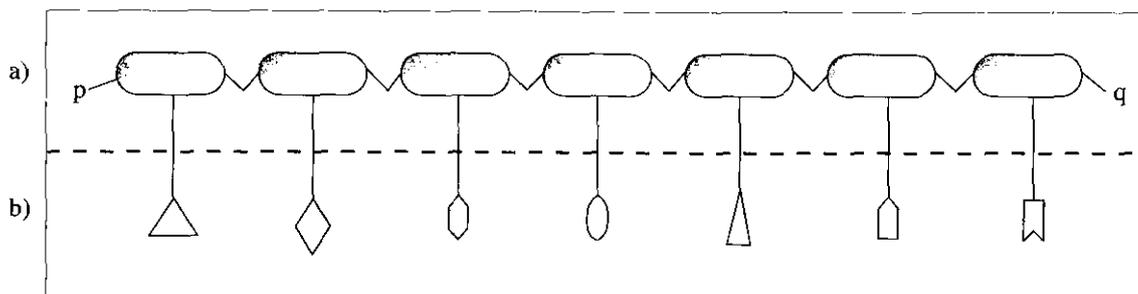


Fig. 9.3. Zonas en la estructura de la macromolécula. En la estructura de la macromolécula se pueden distinguir 2 zonas. En a) aparece representado en azul la zona monótona de la estructura que origina el eje covalente principal de la macromolécula. Observe que estructuralmente todos los sectores de esta zona son iguales. Aparecen marcados los extremos p y q, pues esta molécula tiene polaridad p<sub>6</sub>q. En b) se representa en color rojo la zona variable debido a que cada uno de los precursores presenta una estructura diferente. De esta forma se evidencia que en la estructura de las macromoléculas se da la unión de lo monótono y lo diverso.

La estructura de la zona monótona diferencia los tipos de macromolécula, es decir, las proteínas de los polisacáridos y éstos de los ácidos nucleicos. La zona variable diferencia una macromolécula de otra del mismo tipo, por ejemplo, el glucagón de la insulina. Los métodos para el estudio de la estructura primaria de las macromoléculas del segundo grupo serán estudiados en los capítulos donde se trate cada una de ellas.

La distinción entre las 2 zonas estructurales de las macromoléculas es importante para entender la génesis de los demás niveles de organización, pues ellos van a depender del establecimiento de interacciones entre elementos químicos localizados en una zona u otra. En líneas generales se puede afirmar que si las interacciones se forman entre elementos localizados en la zona monótona, se van a originar estructuras regulares con patrones bien definidos, pero si dependen de la zona variable se formarán organizaciones más bien irregulares.

Como ya se señaló, las macromoléculas del primer grupo donde la monotonía es total tienden a tomar formas fibrilares o filamentosas, en las cuales el largo predomina sobre el ancho y la profundidad. Sin embargo, las del segundo grupo tienden a adoptar formas esféricas como consecuencia de los plegamientos y repliegamientos sobre sí de la cadena polimérica.

Los estudios de las estructuras de numerosas macromoléculas en los últimos años, han permitido profundizar en la complejidad de estas estructuras y advertir que aún en las más irregulares existen determinados patrones que se repiten, como si existiera una ley general que gobernara la forma en que se organizan las macromoléculas biológicas.

### Nivel secundario

Al nivel primario ya estudiado le sigue el nivel secundario o estructura secundaria. Este término se refiere a la forma particular que adopta la cadena polimérica en pequeños sectores de su estructura, pudiera ser un sector formado por 10 a 20 precursores consecutivos. Estos sectores pueden tener una disposición regular o irregular. Se ha podido determinar que existen 2 formas fundamentales de estructuras secundarias regulares a saber, las helicoidales y las plegadas. Las estructuras plegadas se caracterizan porque el eje covalente primario de la molécula va describiendo una línea en forma de zig zag, con ángulos bien definidos, y en ocasiones diferentes sectores de la

misma molécula que toman esta forma se aproximan entre sí, formando una especie de superficie plegada. Si las cadenas tienen la misma polaridad se dice que son paralelas, de lo contrario se les nombra antiparalelas (Fig. 9.4).

Las estructuras helicoidales tienen mayor distribución entre las macromoléculas que las plegadas. Desde el punto de vista matemático se puede considerar que una estructura helicoidal se genera como consecuencia del movimiento de un punto que se desplaza alrededor de la superficie de un cilindro, con un ángulo de inclinación permanente. Cuando el eje covalente principal de una macromolécula adopta esta forma, se dice que tiene una estructura helicoidal.

En las macromoléculas las estructuras helicoidales se definen a partir de 3 parámetros: el paso o avance de la hélice ( $p$ ) es la distancia que existe entre un punto de una de las espiras y la posición equivalente en la espira siguiente, es decir, cuanto avanza el punto en sentido paralelo al eje del cilindro al dar una vuelta completa sobre su superficie; el avance por unidad de repetición ( $d$ ) se refiere a cuánto avanza la hélice con la adición de cada monómero, y el número de unidades repetitivas por espira ( $n$ ) que se refiere a cuántos monómeros hacen falta para pasar de una espira a otra en puntos equivalentes. El valor de  $n$  no tiene necesariamente que ser un número entero y, de hecho, casi nunca lo es. Como puede deducirse estos 3 parámetros están ligados mediante la ecuación:

$$p = n \times d$$

Las hélices pueden ser derechas o izquierdas. Para identificar una hélice se usa la regla de la mano. Se coloca el dedo pulgar orientado en el sentido de avance de la hélice y con el resto de los dedos se intenta seguir la trayectoria de la hélice. Si esto puede hacerse con la mano derecha se dice que la hélice es derecha, de lo contrario es izquierda. Una hélice izquierda y una derecha son estructuras que no pueden superponerse, por tanto, las estructuras helicoidales poseen la propiedad de la quiralidad y lo manifiestan por la desviación del plano de vibración de la luz polarizada. Las medidas del ángulo de rotación se han utilizado para estimar el contenido de estructuras helicoidales en las macromoléculas (Fig. 9.5).

Se debe tener cuidado en no confundir las estructuras helicoidales con las espirales. En las primeras, todas las vueltas son aproximadamente del mismo radio, en tanto en las segundas cada giro presenta un radio mayor que el anterior.

En las macromoléculas, especialmente en las proteínas, estas estructuras se combinan en un grupo de patrones bien establecidos, a los cuales se les suele llamar estructuras supersecundarias. Uno de estos patrones que consiste en 2 hélices unidas por una estructura plegada se muestra en la figura 9.6.

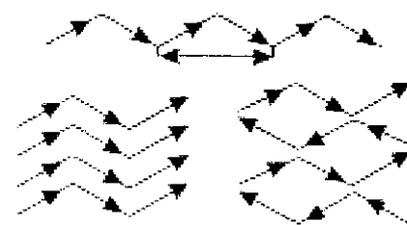
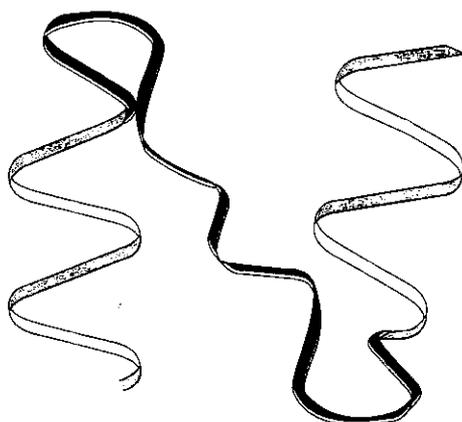


Fig. 9.4. Cadenas plegadas. Arriba se presenta una cadena plegada donde se señala el avance o paso de la estructura. Abajo a la izquierda un grupo de estructuras plegadas paralelas y a la derecha antiparalelas. Las flechas indican la polaridad del polímero.

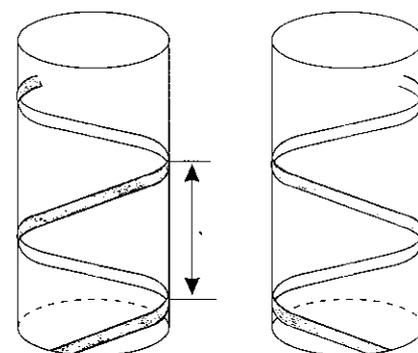


Fig. 9.5. Estructuras helicoidales. A la izquierda se representa una estructura helicoidal derecha y a la derecha una hélice izquierda. Observe que ambas guardan la misma relación que un objeto con su imagen en un espejo plano, por tanto son estructuras asimétricas. La flecha indica el avance o paso de la hélice.

Fig. 9.6. Un modelo de estructura supersecundaria. Dos hélices derechas están conectadas por un segmento de la cadena polimérica en el cual se encuentra una estructura plegada. Este tipo de organización es frecuente en las proteínas.

### Niveles terciario y cuaternario

El nivel terciario de organización o estructura terciaria se refiere a la estructura tridimensional total de la macromolécula. En su estudio se ha de tener en cuenta no sólo las formas secundarias mencionadas, sino la topología del eje covalente principal de la macromolécula, o sea, cómo se van conectando unos con otros los diferentes sectores de estructuras secundarias o supersecundarias. El nivel cuaternario se ha definido en proteínas, y se usa para caracterizar aquéllas que están formadas por más de una cadena polipeptídica que a los efectos reciben el nombre de subunidades (Fig. 9.7).

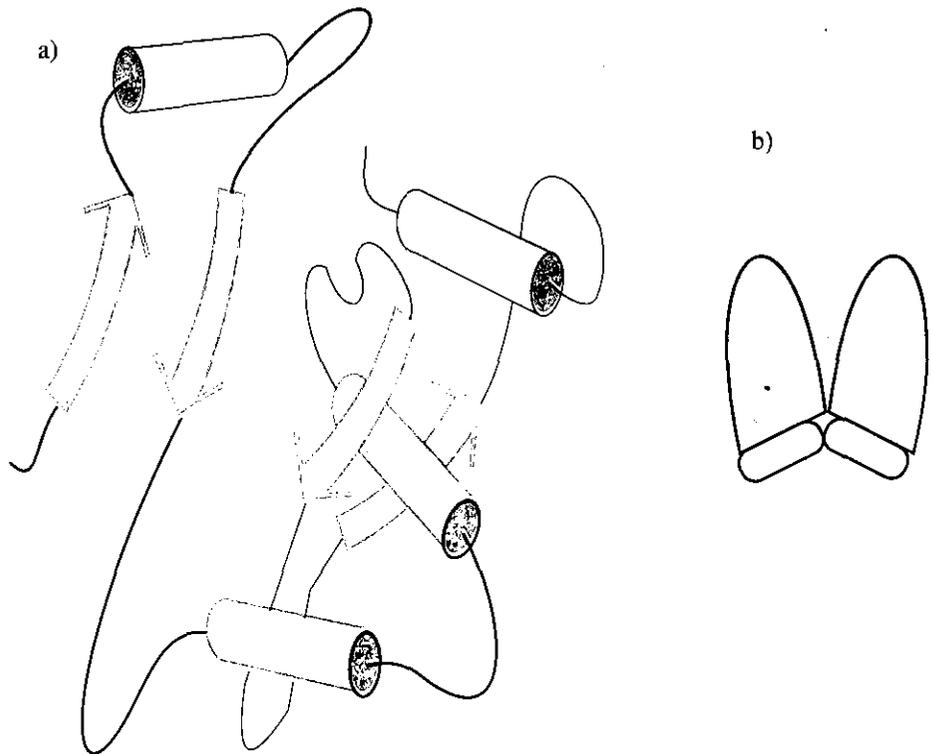


Fig. 9.7. Estructuras terciarias y cuaternarias.

En a) se representa la estructura terciaria de una macromolécula en la cual las estructuras helicoidales aparecen en forma de cilindros y las plegadas en forma de saetas. El eje covalente principal va formando giros que permiten a la macromolécula adoptar una forma que tiende a lo esférico. En b) se presenta un esquema de la estructura cuaternaria de una proteína que está formada por 4 subunidades iguales 2 a 2 (las 2 rojas son iguales, entre sí, así como las 2 azules).

Estas organizaciones espaciales se mantienen gracias a la formación de interacciones débiles entre diferentes grupos químicos de las macromoléculas. Las principales son los puentes de hidrógeno, las interacciones salinas y las llamadas fuerzas de Van der Waals. Estas interacciones tienen una fortaleza que va desde  $10 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , para las primeras hasta menos de  $1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , para las últimas, por tanto su importancia no radica en su fortaleza, sino en el número extraordinario de ellas que pueden formarse en una macromolécula.

La fuerza de los puentes de hidrógeno es más variable, pues es mayor en ambientes anhidros que cuando están expuestos a la acción del agua. Debido a la propia dinámica de formación de la estructura tridimensional de las macromoléculas, cada nivel de organización se mantiene por interacciones que son cada vez más débiles o, lo que es lo mismo, los niveles superiores siempre son más inestables que los inferiores.

Este conocimiento no sólo es importante desde el punto de vista biológico, permite comprender por qué la vida tiene que desarrollarse en condiciones ambientales muy limitadas, también tiene importancia desde el punto de vista experimental, ya que siempre debe tenerse en cuenta que pequeñas variaciones en las condiciones con las cuales se trabaja, con una de estas macromoléculas, puede afectar considerablemente sus propiedades, que son las manifestaciones externas de su estructura.

Cuando una macromolécula pierde su estructura tridimensional, pero conserva la estructura primaria, se dice que ha sufrido un proceso de desnaturalización. Los agen-

tes desnaturizantes interfieren con la formación de las interacciones débiles y por eso son capaces de desorganizar a la molécula. Un agente desnaturizante universal es el calor, de ahí que los seres vivos en general tienden a vivir en medios donde los cambios de temperatura no sean drásticos, incluso, los organismos superiores han creado evolutivamente mecanismos para mantener constante la temperatura corporal con independencia de la ambiental.

El fenómeno de desnaturización puede ser reversible, si la macromolécula desnaturizada es llevada de nuevo a las condiciones adecuadas, por lo que puede recuperar su estructura tridimensional original. Esta renaturalización es una evidencia importante de que la estructura tridimensional está determinada por el nivel primario de organización. Desde el punto de vista práctico, esta propiedad de las macromoléculas sirve de fundamento a las técnicas de hibridación de los ácidos nucleicos como se verá en el capítulo 11 (Fig. 9.8).

### Carácter informacional

Una de las características más importantes de las macromoléculas biológicas es que ellas poseen información. La información molecular está relacionada con la variedad estructural y permite la realización de interacciones específicas entre las diferentes macromoléculas, o entre ellas y moléculas pequeñas.

La información permite discriminar con un elevado grado de precisión con cuál molécula se interactúa, en qué sitio y bajo cuáles circunstancias. Teniendo en cuenta la forma en que se presenta la información molecular puede ser de 2 tipos: la secuencial y la conformacional.

La información secuencial está contenida en la estructura primaria de las macromoléculas que presentan secuencias irregulares, de forma que mientras mayor es la irregularidad de la secuencia mayor puede ser el contenido de información y viceversa. En la secuencia de los precursores de una macromolécula la información está codificada linealmente en forma de mensajes, con un contenido preciso; tal vez una alegoría sirva para esclarecer este concepto. Si se parte de la secuencia de aminoácidos de un péptido y se escribe utilizando el código de una sola letra (capítulo 6) se pueden obtener situaciones como:

ala - met - ile - ser - trc - ala - asp  
A M I S T A D

ala - met - ala - arg - glu - ser - val - ile - val - ile - arg  
A M A R E S V I V I R

Por supuesto que las largas cadenas poliméricas de las macromoléculas contienen mensajes mucho más complejos que los mostrados. Estos mensajes generalmente informan sobre cómo construir una estructura tridimensional, cómo ordenar precursores durante la síntesis de las macromoléculas, dónde comenzar o terminar un proceso, etcétera. La información secuencial es muy estable, ya que está asociada con el nivel primario de organización, que es el más estable en la estructura de una macromolécula cualquiera que ésta sea. Pero este tipo de información no permite interacciones tridimensionales específicas, pues ella aparece en forma lineal.

La información conformacional por su parte está contenida precisamente en la estructura tridimensional, es decir, en la conformación general de la macromolécula y sí permite interacciones específicas en el espacio. La forma característica que adopta una macromolécula le permite ir creando sobre su superficie sitios con una forma y distribución de grupos químicos orientados, de tal manera que permite la ubicación y fijación de otras moléculas cuya forma y distribución de grupos químicos sean complementarias al sitio superficial de la macromolécula. Estos sitios tienen un arreglo tan

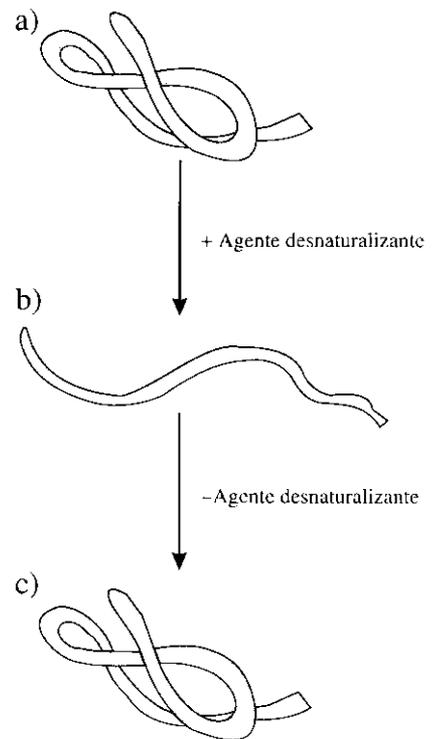


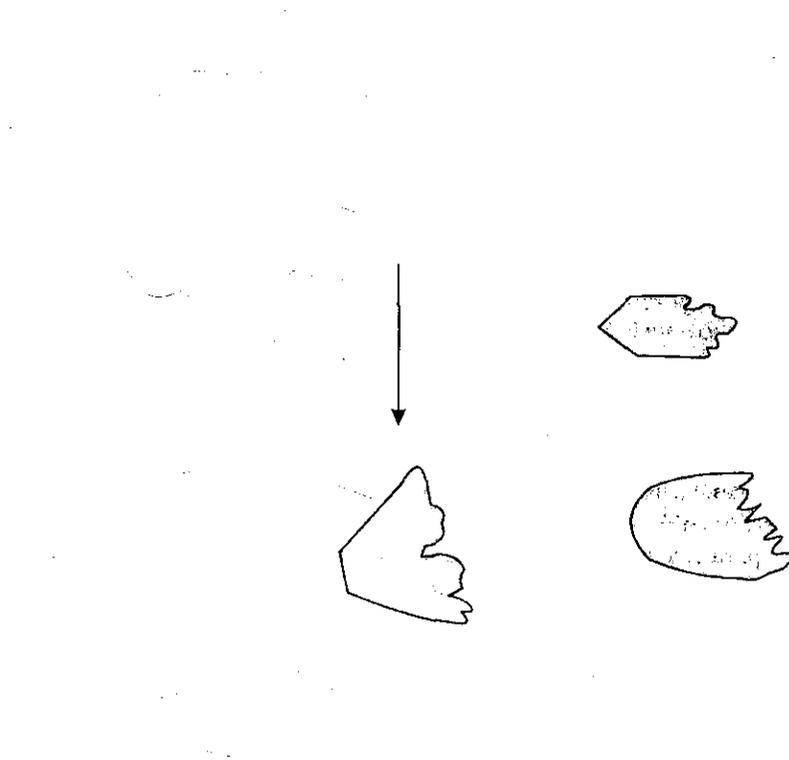
Fig. 9.8. Desnaturización y renaturalización. En a) se muestra la estructura tridimensional de una macromolécula que, al ser sometida a la acción de un agente desnaturizante, adquiere una forma totalmente desordenada conservando sólo el nivel primario de organización como se muestra en b). En muchas ocasiones cuando el agente desnaturizante es retirado, la molécula adopta de nuevo su forma original como se muestra en c). El primer paso representa la desnaturización y el segundo la renaturalización. Este segundo paso no siempre es posible.

estricto que algunas moléculas son capaces de alojarse en ellos y, una vez allí, permiten a la macromolécula realizar sobre ellos una función específica.

Este fenómeno de interacción específica entre una macromolécula y otra biomolécula recibe el nombre de *reconocimiento molecular* y el sitio por donde se realiza *sitio de reconocimiento*, un ejemplo se muestra en la figura 9.9. La sustancia que se une a la macromolécula recibe el nombre genérico de *ligando*.

Los sitios de reconocimiento tienen algunas propiedades comunes como: estar ubicados en la superficie de la macromolécula, lo cual posibilita el acceso del ligando; poseer una estructura tridimensional derivada de la estructura tridimensional general de la macromolécula, que debe ser complementaria a la estructura del ligando; tener grupos químicos orientados en forma conveniente para interactuar con los grupos

Fig. 9.9. Información conformacional. Arriba en rojo la silueta de la estructura tridimensional de una macromolécula, donde se muestra la ubicación del sitio de reconocimiento. Abajo se representan 3 moléculas en verde de las cuales sólo una puede interactuar de forma específica de la macromolécula, pues su estructura es complementaria a la estructura del sitio de reconocimiento. Esta forma específica de interacción es el reconocimiento molecular que es la forma fundamental de expresión de la información conformacional.



químicos de la sustancia reconocida, y hacer que ésta permanezca unida a la macromolécula.

La unión del ligando provoca cambios conformacionales en la macromolécula, los cuales permiten que se realice su función o modulan la intensidad de ésta. Los ligandos pueden ser también macromoléculas, pero en ese caso la zona de contacto se limita a un sector preciso de la estructura y no a toda ella.

Al tratar el carácter tridimensional quedó establecido que las estructuras de orden superior de las macromoléculas, su conformación general estaba determinada por la estructura primaria. Acaba de establecerse que esas estructuras expresan un determinado tipo de información molecular. La primaria está vinculada a la secuencial, y las de orden superior a la conformacional; se infiere que la información conformacional está determinada por la información secuencial. Se había señalado que una de las funciones de la información secuencial era cómo construir determinadas estructuras tridimensionales que son las que albergan la información conformacional; esta relación entre los tipos de información molecular es uno de los fundamentos más importantes en el funcionamiento de los seres vivos.

## **Tendencia a la agregación**

Como fenómeno general, las macromoléculas tienden a agregarse unas con otras formando grandes estructuras supramacromoleculares, de una gran complejidad estructural y funcional cuyas masas moleculares alcanzan los millones de daltons. Estas asociaciones pueden realizarse de forma covalente o no covalente y pueden formarse de manera espontánea o mediante un proceso asistido por otras macromoléculas. La existencia de estos agregados no contradice el carácter de uniformidad, pues las macromoléculas que se asocian no lo hacen con interrupción del eje covalente principal, emplean grupos químicos laterales para el enlace. Casi siempre en estos agregados se encuentran proteínas, de ahí que muchos se describan como formas conjugadas de las proteínas y resalten en el nombre el componente no proteínico; así existen nucleoproteínas, glicoproteínas y lipoproteínas.

La asociación de moléculas de proteínas para formar grandes agregados supera el concepto de estructura cuaternaria que es más limitado. No puede considerarse que los sistemas de microtúbulos o microfilamentos sean proteínas con estructura cuaternaria, sino verdaderos agregados multiproteínicos. Muchos de estos ejemplos serán estudiados en este libro. Las proteínas se asocian con ácidos nucleicos para formar los cromosomas, los ribosomas, los corpúsculos de procesamiento de los ARN y diferentes estructuras particuladas que intervienen en el proceso de síntesis y procesamiento de las proteínas.

La asociación de proteínas con polisacáridos produce las glicoproteínas, de las cuales los ejemplos más sobresalientes son las que forman parte de la matriz extracelular.

Por último, pueden producirse agregados de proteínas con lípidos que son las lipoproteínas. Aun cuando en realidad los lípidos no son macromoléculas, éstos se encuentran asociados en forma de grandes complejos lipídicos, parecidos a como lo hacen las macromoléculas. La estructura de las membranas biológicas y de las grandes lipoproteínas sanguíneas constituyen ejemplos de agregados lipoproteínicos.

## **Relación estructura-función**

Como ya se ha visto, una de las propiedades más sobresalientes de las biomoléculas es que a ellas puede atribuirse una función, a esto no escapan las macromoléculas; lo importante es que esta función está directamente vinculada con la estructura. Este vínculo es casi una ley del comportamiento de las macromoléculas biológicas.

El estudio cada vez más profundo de la organización estructural de las macromoléculas ha permitido ir identificando determinados patrones estructurales que están siempre relacionados con una función particular. Las modernas técnicas de secuenciación de los ADN en ocasiones ha llevado a tener completa la secuencia de aminoácidos de una proteína desconocida, pero a partir de esta secuencia se han determinado algunas características estructurales y funcionales de la proteína incógnita. Se ha sabido que son proteínas transmembranales, o que tienen sitios de unión con nucleótidos, o que actúan como proteínas quinasas, o que se unen con el ADN, etcétera. Numerosos son los aspectos funcionales que pueden deducirse de la secuencia de aminoácidos, basados en el principio de la relación entre la estructura primaria, la conformación y la función. Es posible que llegue el día en que de una estructura pueda saberse su función o viceversa, ese ha sido el sueño de todos los bioquímicos desde los albores de esta ciencia.

## **Propiedades generales**

Estas características generales antes mencionadas se manifiestan de formas diferentes en las macromoléculas, esas son las propiedades generales. A partir de esas

propiedades ha sido posible ir profundizando en el conocimiento de sus características estructurales. A continuación se estudiarán algunas de esas propiedades y se dejará claro con cuál o cuáles de las características estructurales generales están relacionadas.

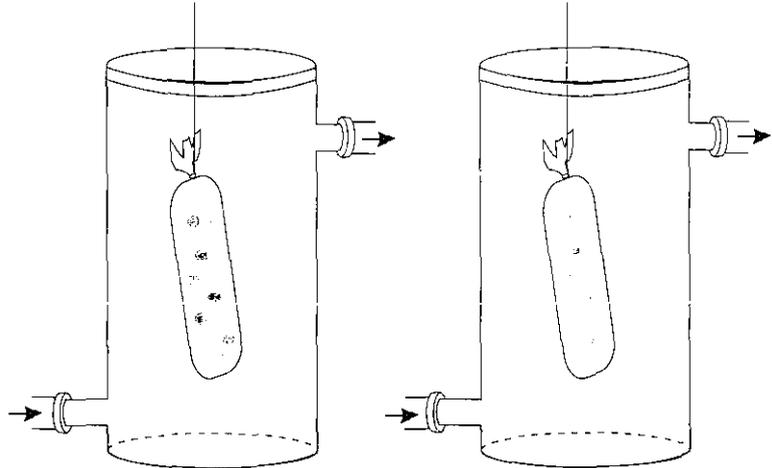
### Difusión

Todas las moléculas cuando son colocadas en el seno de un fluido experimentan movimientos de traslación de un lugar a otro en todas las direcciones del espacio; este fenómeno recibe el nombre de difusión. La velocidad de difusión está influida por diversos factores como la masa de la partícula. Cuando todos los demás factores se mantienen constante, la velocidad de difusión es una función decreciente de la masa de la partícula, o sea, la velocidad disminuye a medida que la masa aumenta; por lo que las macromoléculas exhiben velocidades muy lentas de difusión; incluso existen equipos especialmente diseñados que permiten una estimación aproximada de la masa molecular a partir de las medidas de la velocidad de difusión.

### Diálisis

La diálisis es el proceso mediante el cual una sustancia disuelta en un fluido, que está dividido en 2 compartimentos separados por una membrana, es capaz de pasar de un compartimento al otro hasta que la concentración se iguale en ambos compartimentos. La diferencia de concentración en ambos lados de la membrana crea un gradiente de potencial químico que impulsa el movimiento de la sustancia a través de la membrana; esto es posible gracias a que la membrana posee poros de tamaños muy pequeños, por los cuales la sustancia puede pasar. El gran volumen molecular de las macromoléculas les impide pasar a través de esos poros y por tanto no pueden dializarse (Fig. 9.10).

Fig. 9.10. Diálisis. Una bolsa de celofán que contiene una solución donde se encuentra una macromolécula (círculos rojos) con otras moléculas menores (círculos azules) se sumerge en un solvente que fluye constantemente como se ve a la izquierda. Con el paso del tiempo las moléculas pequeñas abandonan la bolsa de celofán y son arrastradas por el solvente, mientras la macromolécula permanece dentro de la bolsa pues su gran tamaño le impide atravesar los poros del celofán. Las flechas indican la dirección del flujo del solvente externo.



Esta propiedad de las macromoléculas tiene importancia desde los puntos de vista biológico y del trabajo experimental.

Como se sabe, los organismos vivos presentan compartimentos que están separados unos de otros por membranas. Las células que son la unidad estructural y funcional de todos los seres vivos están separadas de su entorno por la membrana plasmática y aún dentro de las células existen compartimentos como el núcleo, las mitocondrias, etcétera, que están separados por membranas del resto de la célula.

La imposibilidad de diálisis de las macromoléculas permite que cada célula y cada compartimento subcelular posea su propia dotación de macromoléculas, sin obligación de compartir el conjunto total de macromoléculas del organismo, como sería el caso si estas sustancias atravesaran libremente las membranas.

Desde el punto de vista experimental la diálisis se usa en la purificación de macromoléculas de contaminantes de baja masa molecular. Para ello la preparación que contiene la macromolécula que se está purificando se coloca en una bolsita de celofán y ésta en un recipiente por donde fluye agua; se genera así un gradiente de potencial químico para cada una de las sustancias que están disueltas dentro de la bolsita que las impulsa a salir de ella; pero como el líquido en el exterior está fluyendo, la concentración en él de esa sustancia es siempre cero y por mucha sustancia que salga las concentraciones en ambos lados del celofán no logran igualarse, sólo la macromolécula no sale. Con un tiempo de diálisis lo suficientemente prolongado (unas 24 h) se puede lograr un grado de purificación aceptable.

### Sedimentación

La física establece que el peso de una sustancia es igual al producto de su masa inercial por la aceleración de la gravedad. Cuando sustancias muy pesadas se colocan en un fluido, con el transcurso del tiempo tienden a ir hacia el fondo del recipiente, o sea, sedimentan. Si se toma un poco de arena y se dispersa en agua, al poco tiempo casi toda la arena habrá sedimentado. Si se quiere aumentar la velocidad de sedimentación se puede colocar el recipiente en una centrífuga y hacerlo girar a gran velocidad; esto se debe a que el movimiento giratorio que realiza la centrífuga incrementa el valor del campo gravitacional. Si en lugar de granitos de arena hubiera en el recipiente partículas más pequeñas, bastaría aumentar la velocidad de la centrífuga para sedimentarlas; esto significa que, en principio al menos, cualquier sustancia por pequeña que sea puede ser sedimentada siempre y cuando se disponga de una centrífuga capaz de alcanzar la velocidad necesaria. En estos momentos existe un límite práctico para ese objetivo y en los equipos modernos sólo se han alcanzado velocidades suficientes para la sedimentación de las macromoléculas, por ser precisamente las moléculas más grandes.

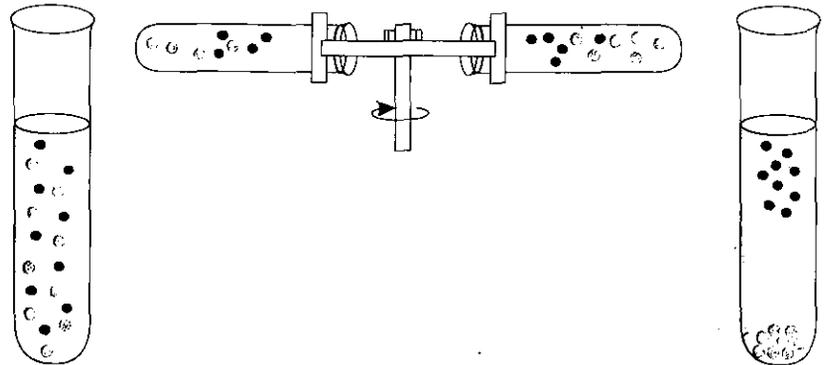
En las centrífugas la velocidad de sedimentación depende de numerosos factores, como la forma y masa de la partícula. En general la velocidad de sedimentación es una función creciente de la masa de la partícula. Como unidad de velocidad de sedimentación se usa el coeficiente de sedimentación *S*, en honor de *The Svedberg*, pionero en este campo, que es igual a  $10^{-13}$  s. Mientras mayor sea el valor de la masa de la partícula mayor será el valor de *S*. En la tabla 9.1 se relacionan algunas macromoléculas biológicas con su peso molecular y su coeficiente de sedimentación.

Tabla 9.1. Masas moleculares (*M*) y coeficiente de sedimentación (*S*) de algunas proteínas

Proteína	M (kD)	S
Lipasa de la leche	6,7	1,14
Ribonucleasa A	12,6	2,00
Citocromo c	13,4	1,71
Mioglobina	16,9	2,04
Citocromo oxidasa	89,8	5,80
Lactato deshidrogenasa H	150	7,31
Catalasa	222	11,20
Fibrinógeno	340	7,63
Glutamato deshidrogenasa	1 015	26,60

En muchas ocasiones se emplea el valor del coeficiente de sedimentación  $S$  como indicativo de masa molecular. La figura 9.11 presenta un resumen esquemático del procedimiento. Esta propiedad de las macromoléculas también ha sido empleada en el proceso de purificación.

Fig. 9.11. Centrifugación. Una solución que contiene una macromolécula (círculos rojos) y otras moléculas más pequeñas se colocan en un tubo de centrifuga. El tubo se hace girar a gran velocidad, con lo cual se aumenta considerablemente el campo gravitacional. Después de un tiempo prudencial las macromoléculas han ido a sedimentarse en el fondo del tubo, mientras las moléculas pequeñas permanecen en solución.



### Visualización

Quizás la más sobresaliente manifestación del carácter macromolecular es que estas moléculas pueden ser visualizadas por medios ópticos especiales, como el microscopio electrónico. Con el grado de perfeccionamiento alcanzado por estos equipos ha sido posible la obtención de microfotografías, donde puede observarse la forma de algunas macromoléculas, especialmente las más grandes, como algunas enzimas, el ácido desoxirribonucleico, etcétera.

### Hidrólisis

Los caracteres polimérico y uniforme se pueden evidenciar mediante la hidrólisis. La adición catalítica de agua al enlace polimerizante provoca la ruptura de éste, que con un tiempo prolongado y condiciones adecuadas puede lograrse la descomposición total del polímero en sus monómeros constituyentes.

Para la hidrólisis se pueden emplear 3 tipos de procedimiento en dependencia del catalizador empleado, y en cada uno se obtienen resultados diferentes. La hidrólisis puede realizarse en medio ácido para los 3 tipos de macromoléculas y es el medio más empleado; sólo produce alteraciones de algunos aminoácidos durante la hidrólisis de las proteínas.

La hidrólisis alcalina produce mayores alteraciones de aminoácidos y no afecta a los ácidos desoxirribonucleicos. La hidrólisis enzimática suele ser parcial, pues la especificidad de las enzimas no le permite a éstas actuar sobre todos los enlaces presentes en una molécula. Aun cuando ninguno de estos procedimientos por separado permite en todos los casos la hidrólisis total de la macromolécula, una adecuada combinación de todos ellos puede dar los resultados deseados.

### Difracción de rayos X

La técnica más empleada para el estudio de la estructura tridimensional de las macromoléculas es la cristalografía de rayos X; para su empleo se requiere la obtención de la macromolécula en estado cristalino y después el cristal obtenido se somete a la acción de los rayos X durante un tiempo prolongado (72 h). Durante su recorrido por el interior del cristal la trayectoria de los rayos se desvía por los núcleos de los átomos

que componen el cristal y esa desviación es mayor mientras mayor sea el tamaño del núcleo. Una vez que los rayos X atraviesan el cristal van a incidir sobre una placa recubierta de una emulsión fotográfica que se vela por la incidencia del rayo. Las placas se cambian cada un número de minutos fijados de antemano, además, durante ese tiempo el cristal se hace girar de forma que se obtienen vistas desde diferentes ángulos. Al concluir el experimento se obtiene una colección de placas con numerosos puntos que indican los sitios donde incidieron los rayos X desviados, como se muestra en la figura 9.12.

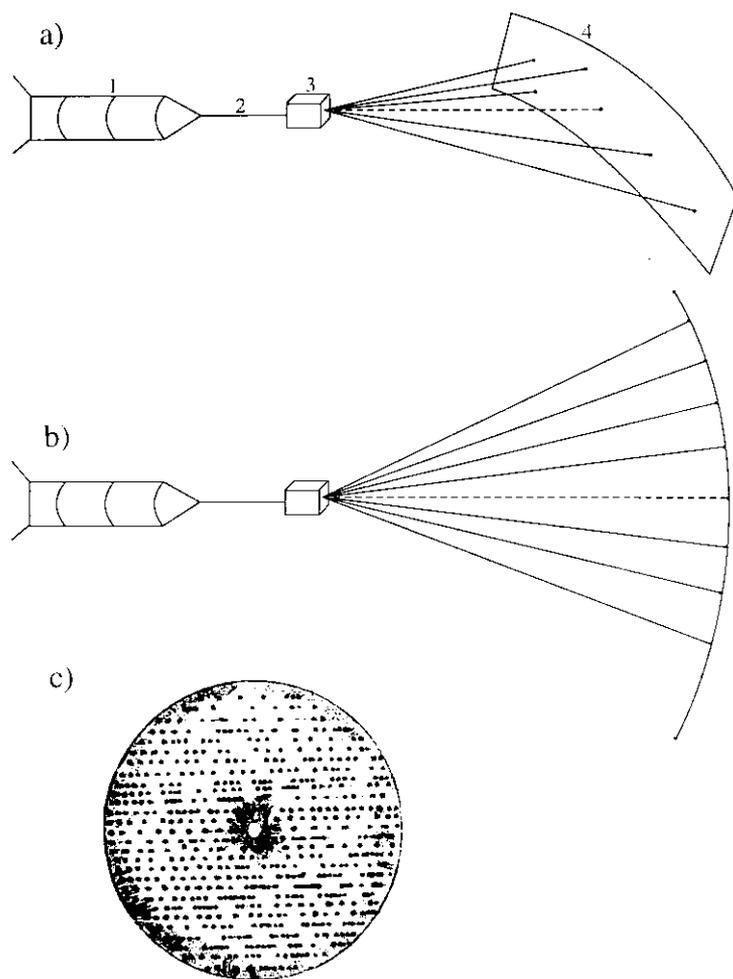


Fig. 9.12. Difracción de rayos X. Se muestra un diagrama del equipo de difracción de rayos X. En a) se ofrece una vista lateral de los elementos esenciales: el dispositivo generador de los rayos X (1), el haz de rayos X (2) que incide sobre el cristal de la macromolécula (3) y los rayos dispersos que inciden sobre una superficie recubierta como una emulsión fotográfica (4). En b) el mismo diagrama pero en una vista desde arriba. En c) un esquema de un fotograma obtenido en el experimento. Los puntos negros representan los lugares donde los rayos desviados velaron la emulsión fotográfica. Miles de estos fotogramas deben ser analizados para obtener la información necesaria sobre la estructura tridimensional de una macromolécula.

El análisis de estos puntos para deducir la estructura tridimensional es extremadamente complejo y en los primeros años de aplicarse esta técnica podía durar meses, pero hoy los cálculos se hacen mucho más rápido con el empleo de las computadoras. Las imágenes que se obtienen presentan un nivel de resolución de varios nanómetros, cuando se dice que una imagen tiene un nivel de resolución de un nanómetro, esto significa que 2 puntos que estén separados por una distancia menor que un nanómetro, en la figura se verán como uno solo. Hoy día se cuenta con un buen número de macromoléculas estudiadas por este procedimiento.

## Métodos empleados en el estudio de las macromoléculas

Numerosos son los métodos empleados en el estudio de las macromoléculas de los cuales sólo se esbozarán los principales. Lo primero es separar la macromolécula del

resto de los componentes celulares, después purificarla lo más posible y, por último, caracterizarla. A continuación se describirá cómo se lleva a cabo cada etapa en líneas generales.

### **Obtención de la macromolécula**

1. Seleccionar el material biológico con el cual se ha de trabajar; se obtiene algún fragmento de un tejido de un organismo viviente que sea particularmente rico en la macromolécula que se pretende purificar. Cuando se trata de macromoléculas muy específicas se debe obtener el organismo que la sintetice, aunque no sea muy rico en ella.
2. Poseer un método que permita siempre localizar dónde está la macromolécula que se pretende purificar; esto es necesario, pues en general todos los procedimientos de purificación consisten en separar la preparación original en 2 o más fracciones, por lo que se requiere localizar en cuál de ellas está la macromolécula de interés.

Se procede a la ruptura de las células por los métodos habituales de homogeneización. El material biológico se puede triturar con la ayuda de un mortero o con equipos diseñados para eso, cuyo objetivo fundamental es romper las paredes o membranas celulares y dejar expuesto el contenido intracelular. Este proceso siempre se realiza a bajas temperaturas, en un líquido de incubación con una composición salina adecuada y un *buffer* que asegure la constancia del pH durante todo el proceso. Al material obtenido como resultado de este proceso se le da el nombre de homogenato. Es conveniente el empleo de inhibidores de las enzimas que hidrolizan la macromolécula que se pretende purificar, pues una vez rota la estructura celular estas enzimas pueden atacar a la macromolécula deseada.

### **Separación de la macromolécula**

Los métodos más usados con este propósito son la ultracentrifugación, la cromatografía y la electroforesis.

En la ultracentrifugación el homogenato se coloca en un tubo de centrifuga que se hace girar a velocidad elevada, con lo cual se produce un incremento notable del campo gravitacional. Bajo la acción de este campo las moléculas pesadas son impulsadas hacia el fondo del tubo, con una velocidad que es una función de varios factores como la forma y el peso molecular. Al final el homogenato queda dividido en 2 fracciones: el sedimento y el sobrenadante. Es necesario entonces localizar en cuál de ellas se encuentra la macromolécula buscada.

Una variante del método puede ser más útil. Se procede a realizar una primera centrifugación a velocidad baja para eliminar los restos de membranas o paredes celulares que deben sedimentar. El sobrenadante se somete a una nueva centrifugación pero ahora a velocidad mayor. Si la macromolécula buscada queda en el sobrenadante se puede repetir el procedimiento a velocidad mayor aún. La lógica del procedimiento consiste en ir eliminando los componentes celulares que no son de interés y obtener una preparación en la cual la concentración de la macromolécula buscada sea cada vez mayor.

Otra variante del método permite obtener mejores resultados. Si a la solución donde va a centrifugarse se le añade una molécula pequeña de rápida difusión, como el CsCl o la sacarosa, ésta se distribuye en el tubo y crea un gradiente de densidad. En esas condiciones los componentes macromoleculares del homogenato se moverán en el tubo de centrifuga hasta que su densidad coincida con la del medio. Moléculas con diferente densidad se equilibrarán en diferentes posiciones y se pueden obtener con el sencillo procedimiento de perforar el fondo del tubo y recoger pequeñas alícuotas de la solución.

Es de esperar que sólo con el empleo de la ultracentrifugación no se logre la purificación total de la macromolécula y se recurre entonces a la cromatografía.

En la cromatografía, la fracción obtenida por ultracentrifugación, que contiene la macromolécula, se adsorbe sobre un sólido embebido en un solvente adecuado y «empaquetado» en un cilindro de vidrio de manera que se forme una columna. El sólido empleado, la longitud y el diámetro de la columna dependen de la macromolécula que se pretende purificar. Una vez depositada la muestra en la columna se hace pasar una solución apropiada para separar los componentes de la mezcla. Este procedimiento recibe el nombre de elusión y al líquido que sale de la columna se le da el nombre de eluato. Pequeñas alícuotas del eluato se van recolectando en tubos de ensayo, de manera que al finalizar, se pueden tener varias docenas de estos tubos. Un registro general, como puede ser la absorción luminosa en determinada longitud de onda, indica dónde se encuentran las macromoléculas del mismo tipo de la que se está purificando. Si los resultados son llevados a una gráfica se obtiene una curva con varios picos (Fig. 9.13).

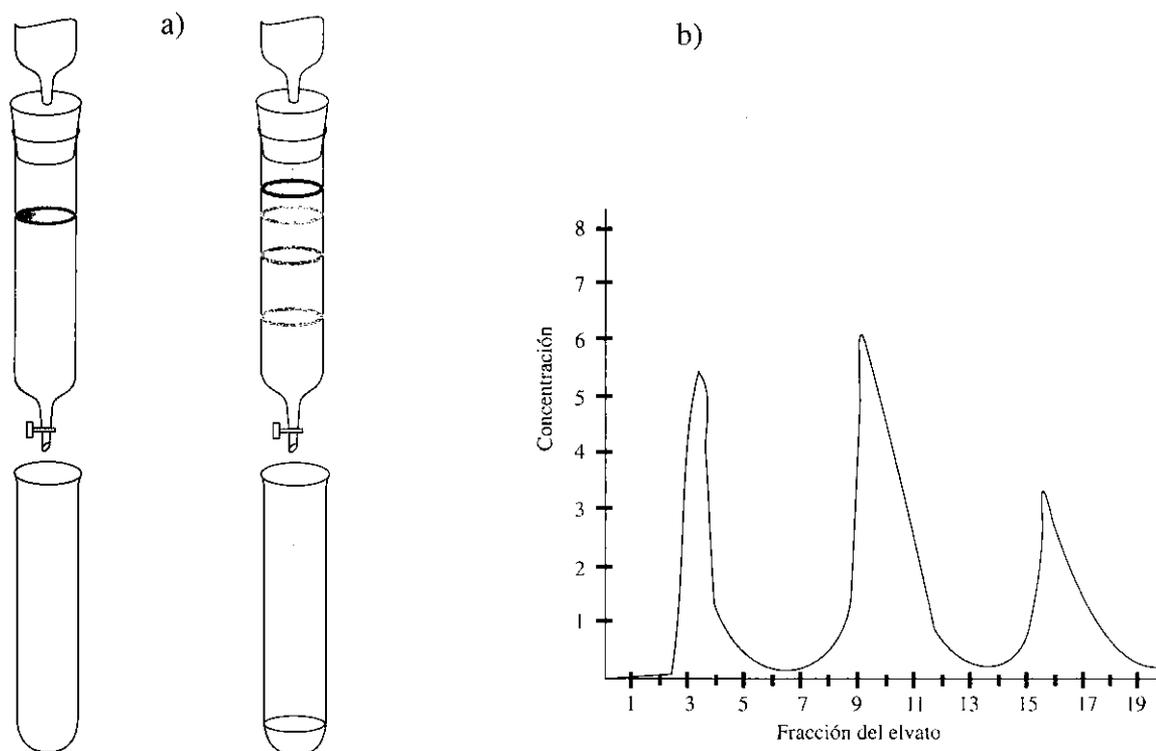


Fig. 9.13. Cromatografía. En a), a la izquierda se ve una columna que contiene un soporte sólido sobre el cual se ha colocado una solución que contiene varios componentes. El tubo está conectado a un recipiente que contiene una solución para la elusión. A medida que el líquido del recipiente superior pasa a través de la columna arrastra consigo los componentes de la mezcla, a velocidades diferentes, con lo cual se logra su separación. En b) se muestra la gráfica formada por varios picos, la que se obtiene cuando se determina la concentración de macromoléculas en cada fracción del eluato. Un método específico permitirá identificar en cuál de esos picos se encuentra la macromolécula que se trata de purificar.

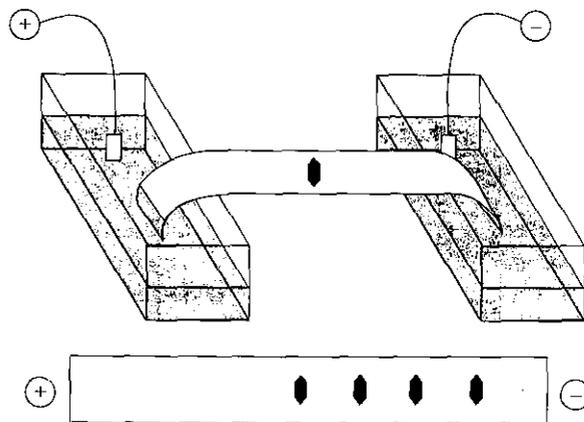
Es necesario entonces utilizar el método de identificación de la macromolécula para determinar en cuáles de los tubos se encuentra, pues casi siempre es en más de uno. Los eluatos que contienen la macromolécula pueden reunirse en uno solo y realizar un nuevo procedimiento cromatográfico, variando el sólido empleado y las condiciones de elusión.

La electroforesis es parecida a la cromatografía, también la mezcla se adsorbe sobre un soporte que en este caso es un gel en contacto con un *buffer* de pH fijo. La fuerza que hace mover las partículas es un campo eléctrico generado por una fuente de poder, conectado a través de electrodos que están colocados en los extremos del gel.

Este procedimiento puede ser empleado en la separación de macromoléculas, porque las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos poseen grupos químicos ionizables que les conceden carga eléctrica. Estas técnicas están muy desarrolladas para las proteínas y los ácidos nucleicos. La movilidad de las moléculas varía inversamente con su masa molecular y directamente con su carga eléctrica neta.

Los geles más usados son los de agar, almidón, poliacrilamida y agarosa en dependencia de la macromolécula que se debe purificar. Para localizar las moléculas, el gel se tiñe con algún reactivo específico que dé coloración visible o sea transiluminado con luz ultravioleta. Después de revelar la electroforesis existen varias bandas que indican la posición de un número igual de macromoléculas en la solución de partida. Hay que emplear entonces el método de determinación específico para la macromolécula buscada (Fig. 9.14).

Fig. 9.14. Electroforesis. Sobre un soporte sólido se coloca la mezcla de varios componentes. El soporte está en contacto con 2 cubetas, donde se ha depositado una solución *buffer* para mantener el pH constante. En cada cubeta está sumergido un electrodo. Al aplicar la corriente eléctrica los componentes de la mezcla se mueven según la intensidad de su carga eléctrica, y pueden separarse como se muestra en la parte inferior de la figura.



En muchas ocasiones las macromoléculas se obtienen en forma de soluciones muy diluidas y es necesario concentrarlas; para ello existen equipos especiales de ultrafiltración o puede recurrirse a la diálisis, como ya fue descrito. Para conservar la macromolécula purificada se puede aplicar el proceso de liofilización.

### Criterios de pureza

Una vez terminado el procedimiento de purificación hay que tener la certeza de la pureza de la macromolécula obtenida; para ello pueden emplearse los mismos procedimientos ya descritos de purificación, pero en todos los casos se deben obtener resultados que confirmen que la macromolécula está pura. Por ejemplo, en la ultracentrifugación con gradiente de densidad se debe obtener una sola banda con una densidad precisa; en la cromatografía se debe obtener un pico único, y una sola banda en la electroforesis, así como de igual forma en todos los procedimientos realizados. No existe un criterio de pureza mejor que los demás, sólo la utilización de varios de ellos puede llevar a la certidumbre de los resultados.

### Caracterización de la macromolécula

Caracterizar la macromolécula significa describir sus propiedades más sobresalientes. Uno de los primeros pasos es la determinación del peso molecular, que puede hacerse por ultracentrifugación analítica o por métodos especiales de electroforesis.

Después se pasa al estudio de la estructura tridimensional. Para el estudio de la estructura primaria se utilizan varios procedimientos que son diferentes para cada tipo de macromolécula y que serán estudiados en los capítulos correspondientes. En relación con la estructura tridimensional se utilizan métodos de espectroscopia y, por último, la difracción de rayos X o la resonancia magnética nuclear que aportan elementos suficientes para el conocimiento de la organización espacial de la macromolécula.

Es conveniente la construcción de un modelo de la macromolécula para compararlo con los datos obtenidos, de forma que se tenga una idea cada vez más aproximada de la estructura tridimensional de la macromolécula purificada. En este momento se puede intentar la correlación entre la estructura y la función de la macromolécula, para ello es necesario la realización de otro conjunto de procedimientos que evidencien los aspectos funcionales. No es el momento de describir esos procedimientos; muchos de ellos serán estudiados en otros capítulos.

## Una incógnita

Una pregunta que siempre se han hecho los investigadores es ¿por qué las macromoléculas son tan grandes?

Una primera respuesta tiene que ver con un aspecto físico del problema. Los seres vivos están formados por células separadas de su entorno por una membrana a través de la cual se establece constantemente un flujo de agua. Este flujo está gobernado por la presión osmótica en ambos lados de la membrana y, a su vez, la presión osmótica depende del número de partículas disueltas. Una macromolécula por muy grande que sea es una partícula y por tanto ejerce una presión osmótica mínima; sin embargo, ella puede contener miles de precursores unidos, cada uno de los cuales si estuvieran independientes se comportarían como una partícula y generarían una presión osmótica elevada, por ejemplo, una molécula de glucógeno puede contener unidas 3 000 moléculas de glucosa; de no estar unidas las moléculas de glucosa generarían una presión osmótica 3 000 veces superior al glucógeno que las contiene a todas. De esta forma las macromoléculas contribuyen a regular el flujo de agua entre la célula y su entorno.

Otro aspecto tiene que ver con la forma de funcionar de estas moléculas. El mecanismo básico es el reconocimiento molecular. Las proteínas, por ejemplo, para crear un sitio de reconocimiento requieren de la participación de no menos de 22 aminoácidos; para mantener en posiciones espaciales bien definidas a esos aminoácidos se requiere el concurso de otros muchos. Si se tiene en cuenta que una misma proteína puede poseer varios sitios de reconocimientos, entonces se entenderá por qué son necesarios tantos precursores en su estructura. Por otra parte el ADN para codificar uno de los aminoácidos de una proteína necesita de 3 nucleótidos, lo cual significa que para un sitio de reconocimiento requiere al menos 66, pero el ADN también requiere de secuencias específicas de nucleótidos que funcionan como señales que indican los puntos donde comienza y donde termina la síntesis de los ARN, así como de motivos estructurales que sirven de lugar de unión para proteínas que controlan su actividad. Igual sucede con otras moléculas informacionales como los ARN. En resumen que son las características tridimensionales y multifuncionales las que condicionan el tamaño que tienen estas moléculas, funciones que al no ser necesarias en los cuerpos carentes de vida hacen que las macromoléculas sean componentes exclusivos de los seres vivos.

## Resumen

El aspecto más sobresaliente en la composición de los seres vivos es la existencia de las macromoléculas; éstas presentan una estructura tridimensional muy compleja que, a primera vista, parece inaccesible al entendimiento humano. Las técnicas experimentales aplicadas a su estudio en las últimas décadas han hecho

posible identificar algunas regularidades en su organización estructural, lo que se ha denominado principio de organización de las macromoléculas.

Todas las biomacromoléculas presentan una masa molecular elevada que se evidencia por su baja velocidad de difusión, su imposibilidad de diálisis, poder de sedimentación al aumentar el campo gravitacional y ser visible por métodos ópticos como el microscopio electrónico. Todas ellas se forman por la polimerización de precursores de la misma clase, mediante un enlace covalente que crea un eje covalente principal, con una estructura monótona que diferencia una macromolécula de otra.

Por otra parte la variedad de los precursores crea una zona de diversidad que diferencia a una macromolécula de otra del mismo tipo. Los diferentes procedimientos de hidrólisis pueden separar los precursores comprobando el carácter polimérico y el uniforme. Las macromoléculas presentan estructuras espaciales que, si se forman por interacciones entre los elementos de la zona monótona, tienden a adoptar formas regulares con patrones bien establecidos como los plegamientos y las hélices, pero, si dependen de la zona variable, tienden a hacerse irregulares y confieren a la macromolécula una estructura tridimensional única.

Los experimentos de desnaturalización y renaturalización confirman que en la mayoría de los casos la estructura tridimensional está determinada por la estructura primaria. A estos niveles estructurales está asociada la información molecular, que puede ser de tipo secuencial o conformacional, esta última, opera mediante el mecanismo del reconocimiento molecular. Las macromoléculas tienden a agregarse formando estructuras supramacromoleculares de una gran complejidad, lo que permite la realización de funciones muy especializadas.

Para el estudio de las macromoléculas se emplean numerosos métodos, que consisten en la obtención de un homogenato a partir de un material biológico, que después se va fraccionando por ultracentrifugación, cromatografía y electroforesis hasta tener la macromolécula en estado de pureza. La caracterización estructural comienza con la determinación del peso molecular, seguida del estudio de la estructura primaria y de la organización tridimensional. La construcción de modelos a partir de los datos experimentales permite aproximarse cada vez más a la estructura real de la macromolécula y comenzar la correlación entre la estructura y la función.

La organización molecular en forma de macromoléculas le proporciona a los seres vivos determinadas ventajas como: la regulación del flujo de líquidos entre el organismo y el entorno, así como la realización de funciones múltiples que con estructuras más simples no se lograrían.

## Ejercicios

1. ¿En qué orden de magnitud se encuentra el peso molecular de las macromoléculas?
2. ¿Qué significa que las macromoléculas tienen carácter polimérico? ¿Cuál es la importancia de ese carácter?
3. ¿Por qué se dice que las macromoléculas tienen carácter uniforme?
4. ¿Cómo pueden demostrarse experimentalmente los caracteres polimérico y uniforme?
5. Una estructura biológica está compuesta de 2 subunidades de 8 S y 14 S, respectivamente. ¿Al centrifugar la partícula completa debe obtenerse un coeficiente de sedimentación de 22 S? Explique su respuesta.
6. ¿Por qué cree usted que como regla, las macromoléculas biológicas no presentan ramificaciones?
7. ¿En qué consiste la información molecular y cuáles son sus formas principales?

8. ¿Podría una macromolécula que no tenga información secuencial poseer información conformacional? ¿Sería válido igualmente el caso contrario?
9. ¿En qué consiste el fenómeno de reconocimiento molecular? ¿Con cuáles de los tipos de información molecular está vinculado directamente?
10. La tendencia a la agregación es una característica general de las macromoléculas. ¿La existencia de las nucleoproteínas, glicoproteínas y lipoproteínas no contradice el carácter uniforme de las macromoléculas? Explique su respuesta.
11. Si usted desea purificar una macromolécula, cuáles son los requisitos previos que debe conocer antes de comenzar el procedimiento.
12. En los 3 capítulos que siguen se estudian en detalle las macromoléculas. Cuando estudie cada uno de ellos diseñe un procedimiento para la purificación de una proteína, de un ácido nucleico y de un polisacárido.