

INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN BÁSICA

J. Muntané Relat

Liver Research Unit, Hospital Universitario Reina Sofía. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREH o Ciberehd). Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba.

Investigación

Concepto

La investigación es un proceso que, mediante la aplicación del método científico, procura obtener información relevante y fidedigna, destinada a entender, verificar, corregir o aplicar el conocimiento. El método científico requiere un estudio reflexivo y sistemático del problema (pregunta científica) que incluye la observación, razonamiento y la predicción, planificación de la experimentación y comunicación de los resultados¹. La investigación es fundamental para el profesional sanitario, formando parte del camino profesional antes, durante y después de lograr la posición facultativa, siendo la propia investigación un fin último de muchos licenciados en medicina².

Clasificación

La investigación se clasifica según su propósito, los medios requeridos para obtener los datos y el nivel de conocimientos que se obtiene como consecuencia del desarrollo del proyecto de investigación.

Según el propósito, la investigación se divide en:

1) Investigación básica: Se denomina investigación pura, teórica o dogmática. Se caracteriza porque se origina en un marco teórico y permanece en él. El objetivo es incrementar los conocimientos científicos pero sin contrastarlos con ningún aspecto práctico.

2) Investigación aplicada: También recibe el nombre de práctica o empírica. Se caracteriza porque busca la aplicación o utilización de los conocimientos que se adquieren. La investigación aplicada depende de los resultados y avances de la investigación básica. Es decir, toda investigación aplicada requiere un marco teórico, aunque lo que le interesa son las consecuencias prácticas.

Según la clase de medios para obtener la información se divide en:

1) Documental: Se basa en la búsqueda de información presente en las bases de datos y documentos previamente elaborados por otros autores.

2) De campo: La información deriva de la simple observación de fenómeno a investigar. Este tipo de investigación puede estar apoyada por informes o documentos sobre el tema objeto de investigación.

3) Experimental: La información deriva totalmente de la intencionalidad de la propuesta científica dirigida a crear el fenómeno mismo a investigar, con intervención del observador para la obtención de unas conclusiones. Este tipo de investigación se denomina ensayo clínico o de tipo experimental en el caso que se base en el análisis de parámetros en pacientes o en animales de experimentación (incluye estudios in vitro), respectivamente.

Según el nivel de conocimiento que se obtiene:

1) Investigación de tipo exploratorio: Este tipo de investigación identifica los aspectos fundamentales de una problemática determinada, y los procedimientos adecuados para una investigación posterior. Es útil desarrollar este tipo de investigación porque, al contar con sus resultados, se simplifica abrir líneas de investigación y proceder a su consecuente

CORRESPONDENCIA

Jordi Muntané Relat
Liver Research Unit. Hospital Universitario Reina Sofía.
Av. Menéndez Pidal s/n
14004-Córdoba.

jordi.muntane.exts@juntadeandalucia.es

comprobación.

2) Investigación descriptiva: Este tipo de investigación se basa en el análisis pormenorizado del fenómeno a estudiar, lográndose caracterizar la patología en concreto, lo que puede servir de base para investigaciones que requieran un mayor nivel de profundidad.

3) Investigación explicativa: Este tipo de investigación requiere la combinación de los métodos analítico y sintético, deductivo e inductivo. Es la investigación de más alto nivel pues profundiza en los mecanismos de la enfermedad y permite identificar los puntos clave de la enfermedad para su potencial tratamiento. Trata en definitiva de responder la pregunta de investigación.

Características

La investigación debe estar planificada, es decir, que se base en un proyecto de investigación en el que queden constancia, los antecedentes, hipótesis, objetivos, métodos, recolección de datos (criterios de validez, objetividad, confiabilidad y discriminación), análisis estadístico, cronograma y presupuesto solicitado. La investigación debe ser original, esto es, apuntar a un conocimiento que no se posee o que está en duda y es necesario verificar. No debe ser una repetición o reorganización de conocimientos que ya se poseen. Al final del proceso de investigación, se debe elaborar la memoria científica con los datos obtenidos presentados preferentemente en forma numérica (o cuantitativa), pues son fácilmente representables y comprensibles. Los resultados y conclusiones derivadas del proyecto de investigación y/o de los artículos científicos publicados serán base para otros proyectos de investigación. Este proceso lineal requiere que los resultados deben ser comprobables y verificables en diversos laboratorios bajo unas mismas condiciones experimentales. Esta evaluación del proceso solo es posible si el proyecto de investigación se ha realizado con el máximo rigor científico tanto del método, objetividad y número de replicas o pacientes.

Modelos experimentales

El desarrollo de un proyecto de investigación experimental requiere de la elección de un buen modelo experimental para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la patología en estudio, así como su prevención, diagnóstico y tratamiento. Los modelos experimentales pueden ser destinados a estudios *in vivo* o *in vitro*.

Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* requieren de modelos animales que hayan sido caracterizados y que sean representativos de la enfermedad o patología que se pretenda investigar. Los modelos experimentales más utilizados para las diversas patologías son:

1) Lesión hepática o fallo hepático fulminante

Se han utilizado numerosos tóxicos para inducir una lesión tisular aguda, entre los que se encuentra la D-galactosamina (500 mg/kg-4 gr/kg *i.p.*), acetaminofeno (500 mg/kg-2 gr/kg *i.p.*), CCl₄ (0.05-1 ml/kg *i.p.*), tioacetamida (50-500 mg/kg *i.p.*), aflatoxina B1 (3-300 mg/kg *i.p.*), cocaína (60 mg/kg *i.p.*), anticuerpos anti-Fas (500 mg/kg *i.p.*), resección hepática + obstrucción portal (**Figura 1**), etc³.

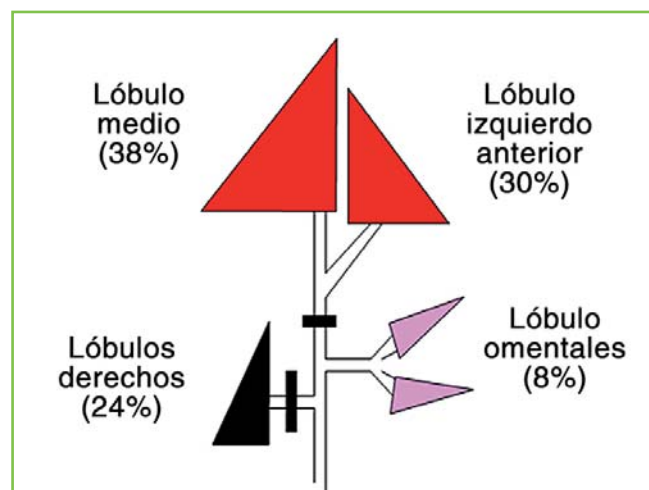


Figura 1

Volúmenes resecables de los distintos lóbulos hepáticos. Los distintos grados de resección equivalen a distintos modelos experimentales.

2) Cirrosis hepática-Hepatocarcinoma

La generación de cirrosis hepática y su posterior evolución a nódulos displásicos y hepatocarcinoma se puede inducir mediante diversas moléculas tóxicas, modificaciones anatómicas o intervención nutricional, infección viral, así como en diversos animales con deficiencias genéticas (modelos genéticos). En realidad la lesión hepática crónica y generación de cáncer se produce por una sucesión temporal de procesos de lesión o destrucción seguidos de respuesta inflamatoria y proliferación celular. Los modelos pueden ser por:

Cirrosis tóxica: Se produce por la administración prolongada de CCl₄ (0.15 ml solución comercial 3 veces por semana y durante 8 semanas), inhalación de vapores de CCl₄ durante 3 meses con administración de fenobarbital (150 mg/kg *i.p.*), tioacetamida (100 mg/l de solución de bebida durante 3 meses), aflatoxina B1 (150 µg/día) en la dieta durante 3 meses, dietilnitrosamina administrada a 10 mg/kg día (0.1 ml solución comercial/100 ml de bebida), o 150 mg/kg (vía intraperitoneal) con 0.2% de 2-acetilaminofluoreno en dieta durante 3 meses^{4,5}.

Cirrosis alcohólica: La cirrosis alcohólica se induce mediante la administración de una dieta comercial denominada de Lieber-Carli, así como con la administración intragástrica de alcohol (1 ml etanol/3 veces por semana y durante 2 meses).

Cirrosis nutricional: Se puede inducir con una dieta

comercial ICN con elevado contenido en grasas, deficiente en colina y sin vitamina B12, ácido fólico ni metionina. También se induce en los modelos genéticos basados en la deficiencia de los receptores de leptinas (ratas Zucker o ratones ob/ob), etc.

Modelos por agentes infecciosos, por células tumorales o modelos genéticos: La cirrosis hepática y su posterior evolución a cáncer se puede producir en marmotas mediante la infección con un virus específico. La implantación de células tumorales (10^5 células) vía subcutánea en el dorso es un modelo extendido de validación de un tratamiento anti-tumoral. Existen diversos modelos genéticos de cáncer, como la sobreexpresión de oncogenes, y la deficiente expresión de genes supresores de los procesos oncogénicos, o bien la sobreexpresión de partículas o sub-partículas virales.

3) Shock séptico

El shock séptico se puede inducir mediante la administración de lipopolisacárido (500 mg/kg) con D-galactosamina (500 mg/kg) o con Actinomicina D (7 mg/kg) o con cicloheximida A (10 mg/kg), así como con la administración de D-galactosamina (500 mg/kg) y TNF- α (25 mg/kg).

4) Ictericia obstructiva

Se obtiene con obstrucción del colédoco, y la lesión tisular es proporcional al tiempo de aplicación de la interrupción del flujo biliar que puede oscilar entre 1 semana a 3 meses.

5) Regeneración hepática

La regeneración hepática se puede inducir de forma intensa mediante la realización de una hepatectomía del 70 al 90%. La regeneración hepática tiene lugar en el tejido remanente y no en el resecaado, y el tamaño o peso original se recupera a la semana de la intervención.

6) Isquemia-reperfusión

La lesión de preservación se puede obtener mediante el clampaje de la vena porta durante 1 hora y la posterior apertura del flujo sanguíneo. El desarrollo del trasplante hepático experimental también es un excelente modelo de lesión de preservación aunque sus objetivos experimentales son más amplios.

7) Hipertensión portal

Esta alteración de la dinámica vascular hepática puede obtenerse con una ligadura parcial de vena porta durante 3 semanas.

8) Pancreatitis-cáncer pancreático

La lesión pancreática se induce con una obstrucción de la arteria gastro-duodenal e inferior esplénica durante 1 hora en los animales de experimentación. La administración

de N-nitrosobis (2-oxopropyl) amina (BOP, 10 mg/kg) durante 3 meses es un modelo aceptado de tumor en páncreas aunque también genera metástasis en hígado o pulmón⁶.

9) Enfermedad inflamatoria intestinal

Se han descrito una serie de modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal. Diversos animales como el titi y los ratones (CH3/HeJBir) desarrollan de forma espontánea dicha patología. También la administración de agentes irritantes (ácido acético, etanol, NSAID, carragenina, TNBS, oxazolona, etc), así como la transferencia de células CD4+ a ratones inmunodeficientes induce enfermedad inflamatoria intestinal. Existen comercializados diversos modelos genéticos de enfermedad inflamatoria intestinal⁷.

Estudios in vitro

Los experimentos in vitro consisten en la simplificación del estudio al ámbito de uno o dos tipos celulares. Estos estudios descartan las señales reguladoras pertenecientes a otros sistemas u órganos sobre los tipos celulares en estudio. Sin embargo, permite controlar o intervenir de forma precisa en los mecanismos intracelulares o extracelulares que participan en la patología. El sistema consiste en el aislamiento enzimático de un tipo celular en condiciones de supervivencia máxima (80-100 %), y su mantenimiento en condiciones controladas de oxígeno, CO₂, nutrientes, metabolitos, soporte de adherencia y densidad celular por un periodo de tiempo concreto. Asimismo, existen sistemas de cultivo que permiten el co-cultivo de dos tipos celulares de forma simultánea sin contacto celular directo, y separados por una membrana semipermeable que facilita la comunicación bioquímica entre ambos tipos celulares.

Aislamiento de hepatocitos y células de Kupffer

El aislamiento de hepatocitos y células de Kupffer se lleva a cabo mediante la dispersión enzimática del hígado, que mantiene las células viables y con alto rendimiento en animales de experimentación. El proceso puede realizarse igualmente en biopsias procedentes de resecciones hepáticas de pacientes previo consentimiento por escrito. El aislamiento se realiza mediante la perfusión por vía portal, primero con 400 ml de la solución de perfusión 1 (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 6.7 mM KCl, 2.4 mM EGTA) a pH 7.4 a 37°C (200 ml a 40 ml/minuto, seguido de 200 ml a 20 ml/minuto). El EGTA permite hacer una primera disgregación por captación del calcio que participa en las uniones intercelulares. Posteriormente, se cambia a 100 ml de solución de perfusión 2 (50 mg/100 ml colagenasa, 1 g/100 ml albúmina, 67 mM NaCl, 6.7 mM KCl, 100 mM HEPES y 4.8 mM Ca₂Cl) a pH 7.4 a 37°C y a un flujo de 20 ml/minuto. Finalizada la perfusión, se retira el hígado del animal y se transfiere con la capsula de Glise incluida a una placa de Petri, y se procede a su disgregación con pinzas. Las células se filtran a través de una fibra de nylon de 150 μ m, y se precipitan a 50 g durante 5 minutos. El precipitado contiene esencialmente hepatocitos aptos para el cultivo primario. El sobrenadante que contiene células no parenquimales (Kupffer y endoteliales) se centrifuga a 250 g durante 5 minutos, y las células precipitadas se lavan 2 veces más con PBS (137 mM

NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄). La población de células de Kupffer se puede aislar mediante un gradiente de Percoll (Pharmacia) preformado (a partir de una solución de Percoll de densidad 1.05 y centrifugada a 30000 g durante 30 minutos a 4°C) que se centrifuga a 800 g durante 30 minutos a 4°C. La fracción de células de Kupffer, situada a una densidad de 1.045, y las células endoteliales a 1.030, se recoge y se lavan dos veces con medio William's sin rojo fenol a 1000 g a 4°C durante 5 minutos. La población de células de Kupffer también se puede purificar de forma alternativa con una centrifuga de elutriación que consiste en la infusión de la suspensión celular en una cámara de elutriación a un flujo determinado (0-200 ml/min) y que se somete a centrifugación de 2000 rpm a 4°C. En ambos casos, la presencia de células de Kupffer o células endoteliales debe ser posteriormente confirmada por inmunocitoquímica (CD45, o CD34 o CD133 para células de Kupffer y endoteliales, respectivamente) o por su capacidad para fagocitar partículas de látex (células de Kupffer).

Las células se mantienen en diversos medios de cultivo en condiciones pre-establecidas de idoneidad. Los hepatocitos de rata y Kupffer se cultivan adecuadamente en el medio de William's con/sin rojo fenol complementado con insulina (1 µM), HEPES (15 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) en placas con una base de colágeno tipo I a una densidad de 150 000 células/cm² (células confluentes). La adherencia de las células se facilita con la incubación de las células con el medio de cultivo en presencia de 10 de suero bovino fetal durante 3 horas. A las 24 h desde el aislamiento, las células están aptas para el inicio del estudio con la adición de los distintos tratamientos o tóxicos.

Metodología: técnicas básicas en biología celular

Lisis celular y fraccionamiento sub-celular

Métodos de rotura de tejidos y células

La disgregación de los tejidos y la lisis de las células en cultivo pueden realizarse mediante homogenización o por procesos de congelación/descongelación. Los medios de disgregación/lisis suelen tener detergentes suaves que facilitan la disrupción de la membrana celular e inhibidores de proteasas que previenen la degradación de las proteínas en estudio.

Centrifugación diferencial

Tras el lisado celular o tisular se procede a la separación de las distintas fracciones sub-celulares mediante el centrifugado de la muestra a diferentes velocidades (g). La separación de los distintos componentes celulares se realiza en función de la densidad y tamaño (Figura 2).

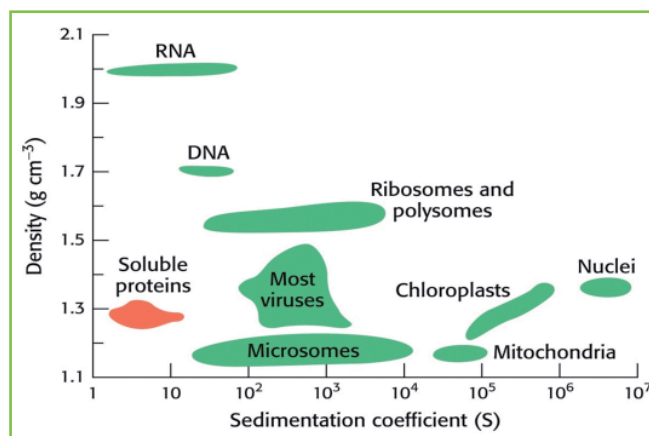


Figura 2

Distribución de los orgánulos celulares en función de su densidad celular.

Análisis de proteínas

Técnicas de separación de proteínas

La separación y análisis de las proteínas de un homogenado tisular o lisado celular se realiza por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), con la posterior identificación de las proteínas de forma inespecífica mediante su tinción, o de forma específica mediante técnicas de inmunocitoquímica como el Western-blot.

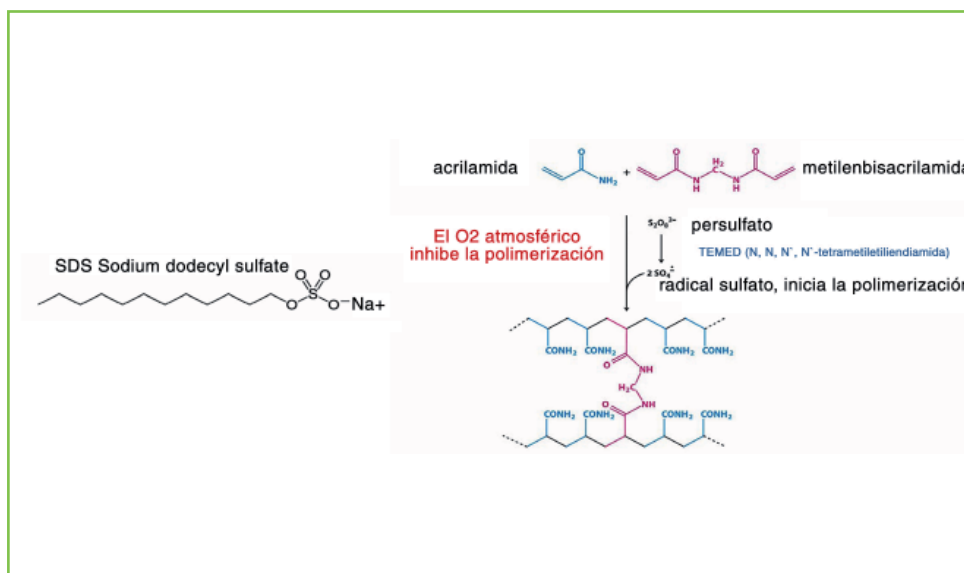
La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) consiste en la migración de las proteínas de la muestra gracias a su peso molecular. La fuerza de migración es de tipo eléctrico desde el cátodo (-) nivel al cual se depositan las proteínas con carga negativa hacia el ánodo (+). La presencia de sulfato dodecil sódico (SDS, sodium dodecyl sulfato) rompe las interacciones no covalentes de las proteínas, desnaturaliza, se une a los aminoácidos en una relación 1:2, y enmascara la carga eléctrica propia de la proteína, convirtiéndola en negativa.

La relación de acrilamida/bisacrilamida afecta al tamaño del poro del gel, cuya polimerización se realiza con el persulfato amónico y TEMED según la figura 3^a.

Los geles pueden ser de tipo continuo o discontinuo con una densidad variable que depende del grado de dilución de la poliacrilamida en el volumen de polimerización. En el caso del gradiente discontinuo existe una porción de gel concentrador con una densidad elevada que sirve para compactar la muestra en el frente de migración, y debajo un gel separador con una densidad que oscila entre 6-15 % que permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular (Figura 4).

Análisis de geles

El análisis de las proteínas de los geles SDS-PAGE puede ser de tipo inespecífico o específico. Los métodos de

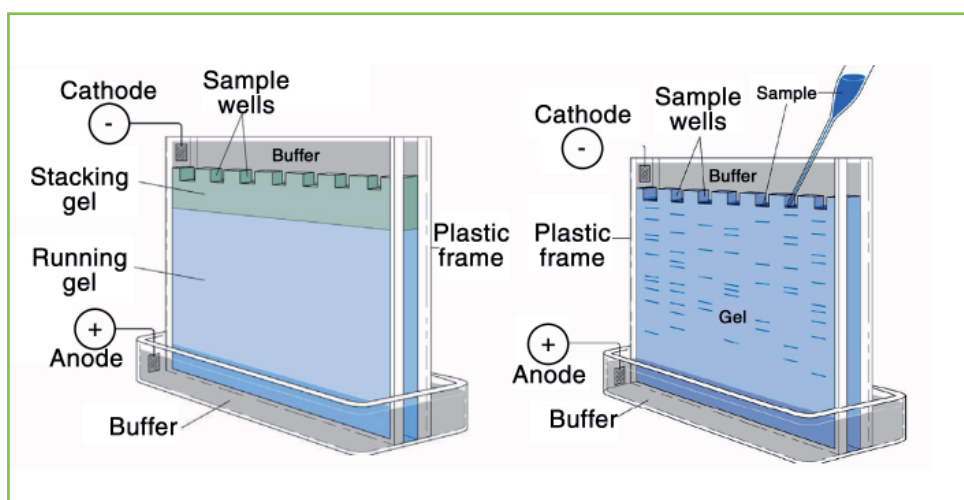
**Figura 3**

SDS y reacción de polimerización de la poliacrilamida.

tinción son considerados inespecíficos porque marcan todas las proteínas en función de alguna característica físico-química inherente a la proteína. Entre los métodos de tinción más utilizados se encuentra el azul de Coomassie (R-250), tinción de plata, marcadores fluorescentes (Sypro Ruby, o los fluoróforos utilizados en el DIGE), marcaje con radioisótopos (³⁵S). El marcaje de las proteínas permitirá el cálculo de sus pesos moleculares mediante la utilización de un patrón (Figura 5).

El análisis específico de las proteínas se realiza por medios inmunoquímicos como el Western-blot que consiste en la transferencia de las proteínas de un gel de electroforesis SDS-PAGE hacia una membrana de nitrocelulosa mediante una

fuerza de migración de tipo eléctrico aprovechando la carga negativa de las proteínas. Los sitios de unión inespecíficos de la membrana de nitrocelulosa son bloqueados con una solución comercial a base de albúmina, y tras diversos lavados, la membrana es incubada con un anticuerpo primario específico frente a la proteína en estudio. Los anticuerpos pueden ser de tipo policlonal o monoclonal, así como obtenidos de forma comercial o de conejo en el propio laboratorio de investigación. El anticuerpo primario unido al antígeno se detecta mediante un anticuerpo denominado secundario que detecta la iso-especie del anticuerpo primario, y está marcado con un enzima de revelado que se detecta de forma usual por reacciones colorimétricas o quimioluminiscentes. El proceso está esquematizado en la Figura 6.

**Figura 4**

Electroforesis en geles discontinuo de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Esquema obtenido de Introduction to Antibodies 2ND Edition. Chemicon International, Inc. www.chemicon.com

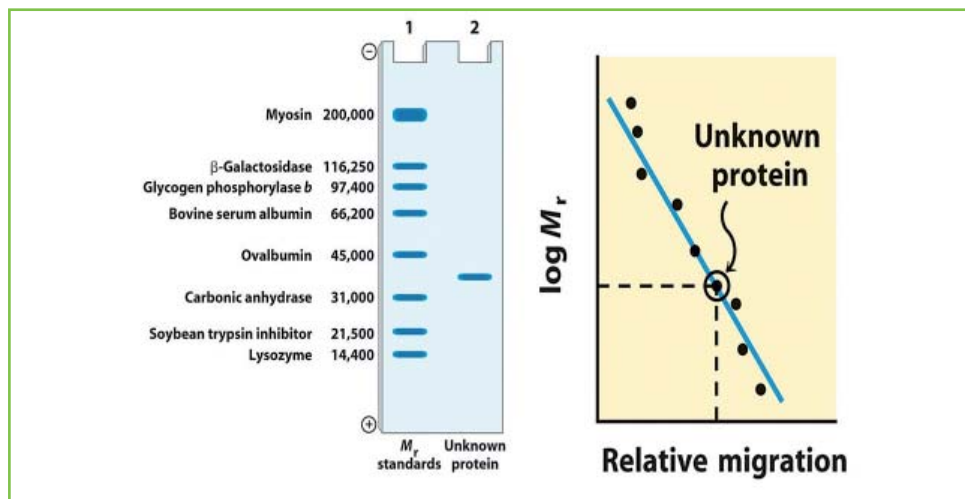


Figura 5

Cálculo del peso molecular de las proteínas en una electroforesis en gel de policacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Análisis de proteínas en lisado celular o sangre

La cuantificación de los niveles de una proteína específica en un muestra biológica (sangre, medio de cultivo, orina, etc) puede realizarse mediante el denominado Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o ELISA. Existen dos tipos de ELISA: de tipo "sándwich" y competitivo. El primero se basa en la identificación de la proteína en estudio de la muestra mediante 2 anticuerpos primarios específicos, uno de ellos se encuentra fijado a su superficie sólida de una placa de microtitración (96 pocillos). El ELISA de tipo competitivo consiste en la competencia entre el antígeno en estudio procedente de la muestra y una cantidad conocida del propio antígeno contenido en un patrón, frente a un anticuerpo primario

específico. En el ELISA competitivo se puede fijar el anticuerpo o bien la cantidad conocida de patrón a una superficie sólida de una placa de microtitración (96 pocillos). Debido a que el ELISA y el Western-blot son técnicas inmunoquímicas, el procedimiento es semejante y se basa en la detección del complejo antígeno y el anticuerpo primario por un anticuerpo secundario, que detecta la iso-especie del anticuerpo primario, marcado con un enzima de revelado que se detecta igualmente bien por una reacción colorimétrica o quimioluminiscente. La cantidad de antígeno de la muestra se extrapola de los valores de absorbancia o quimioluminiscencia obtenidos de una recta patrón igualmente incluida en el ELISA. El proceso está esquematizado en la **Figura 7**.

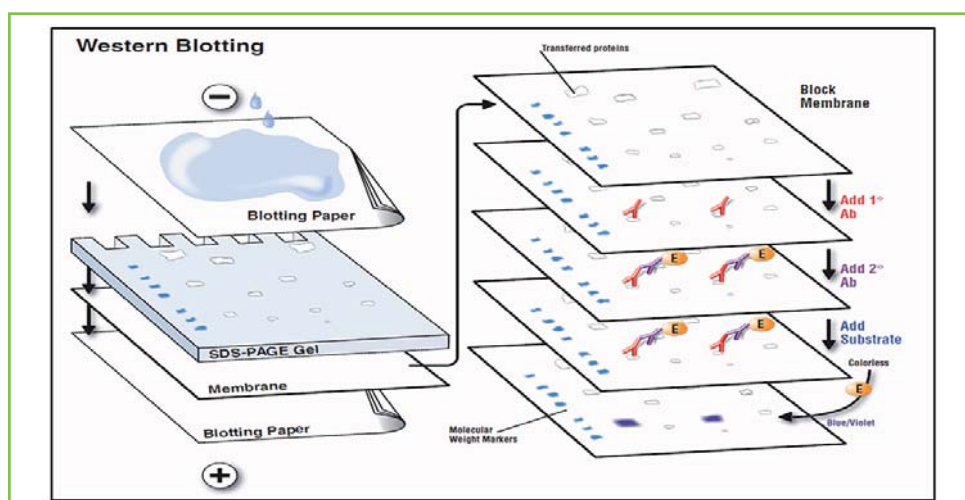


Figura 6

Esquema del proceso de Western-blot obtenido de Introduction to Antibodies 2ND Edition. Chemicon International, Inc. www.chemicon.com

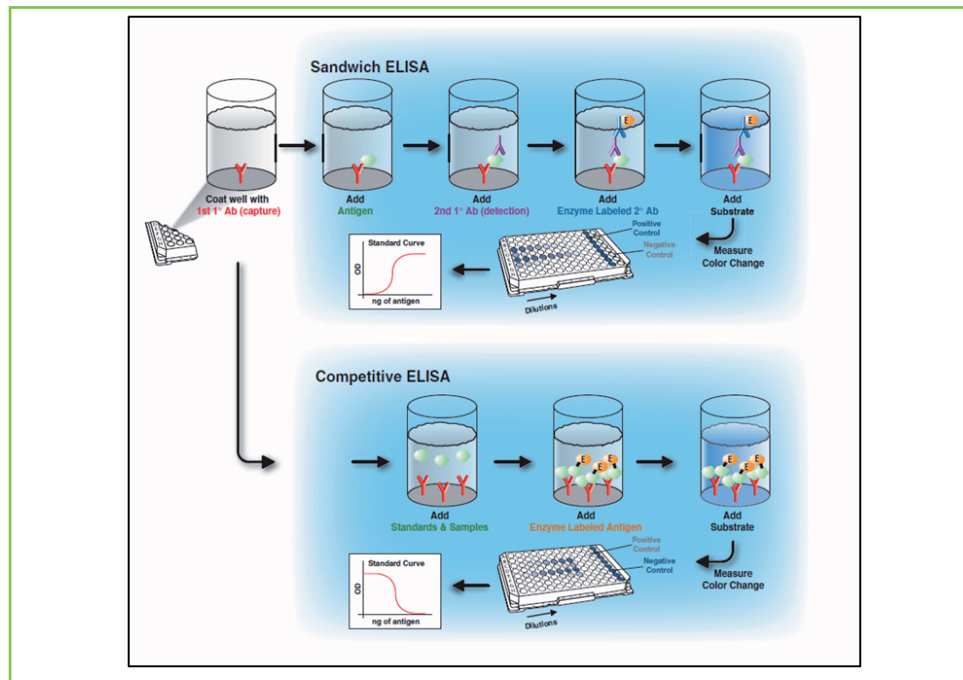


Figura 7

Esquema del proceso de ELISA obtenido de Introduction to Antibodies 2ND Edition. Chemicon International, Inc. www.chemicon.com.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado gracias al CIBERehd fundado por el Instituto de Salud Carlos III.

BIBLIOGRAFÍA

1. Descartes. Discurso del Método (1637). <http://www.librosmaravillosos.com/metodo/biografia.html>
2. Ramón y Cajal. Los Tónicos de la Voluntad: Reglas y Consejos sobre Investigación Científica. Formación Alcalá 2009
3. Butterworth BE, Smith-Oliver T, Earle L, Louny DJ, White RD, Doolittle DJ, Working PK, Cattley RC, Jirtle R, Michalopoulos G, et al. Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Research* 1989; 49:1075-1084.
4. Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, Basivireddy J, Pulimood AB, Ramachandran A, Balasubramanian KA. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:947-957.
5. Qian C, Idoate M, Bilbao R, Sangro B, Bruna O, Vazquez J, Prieto J. Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1997; 8:349-358.
6. Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceno J, Collado JA, Muñoz-Castaneda JR, Ortega R, Cruz A, Tunez I, Montilla P, Pera C, Muntane J. *J Pineal Res* 2006; 40:195-203.
7. Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animals models. *Scan J Gastroenterol* 1992; 27:529-537.
8. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.