

Curso de Introducción al conocimiento científico experimental*

por Celia E.Coto**

Capítulo 1. Introducción

El conocimiento científico es el resultado de una actividad humana de carácter social, que se realiza colectivamente, y de cuyos resultados se desprenden muchas aplicaciones prácticas, las cuales contribuyen a la satisfacción de nuestras necesidades y al mejoramiento de las condiciones en que vivimos.

La ciencia es la explicación objetiva y racional del universo

Es una explicación porque describe las diversas formas en que se manifiestan los procesos existentes. Distingue entre las fases sucesivas y coexistentes observadas en su desarrollo y desentraña sus enlaces internos y sus conexiones con otros procesos poniendo al descubierto las interacciones que son necesarias para que ocurra cada proceso.

La explicación científica es objetiva

Representa las formas en que los procesos manifiestan su existencia. Esa existencia no depende de las sensaciones, ni de las conciencias, el pensamiento, las pasiones, la voluntad, la imaginación o la ignorancia de los sujetos que las conocen. Se trata de una existencia propia. La explicación científica se refiere a procesos que existen objetivamente y, a la vez, ella misma es objetiva, en tanto que refleja con fidelidad cada vez más aproximada a los procesos existentes y su comportamiento. Por eso es que todo conocimiento puede ser verificado y confirmado en cualquier momento y por parte de cualquier persona y en cualquier laboratorio del mundo.

La explicación científica es racional

Porque establece una imagen racional de cada uno de los procesos que llega a ser conocido, lo mismo que cada una de sus propiedades y de sus interrelaciones con los otros procesos. La explicación científica encuentra las conexiones racionales que son posibles entre todos y cada uno de sus conocimientos adquiridos, construyendo así una red de vínculos, implicaciones y otros tipos de relaciones. Después, dichas conexiones racionales serán sometidas a la prueba decisiva de la experiencia, ajustándolas, modificándolas o afinándolas cuántas veces sea necesario y hasta que representen los enlaces que existen efectivamente entre los procesos reales. Cuando eso se consigue y, sólo entonces, las conexiones reales se convierten en conocimientos objetivos.

El universo, objeto único que la ciencia descubre y explica, es el conjunto total de los procesos que existen de manera independiente a cualquier sujeto y al modo de como éste los conozca, los ignore o se los imagine. En ese conjunto total de lo que existe objetivamente, está incluido el hombre como una de las partes integrantes. También están comprendidos los diversos nexos existentes entre el hombre y los procesos

naturales, al igual que las relaciones sociales establecidas entre los hombres. Por consiguiente, el universo es una fuente inagotable de conocimiento científico y, a la vez, la base ineludible para su comprobación. El universo en su conjunto tiene también una existencia objetiva, al igual que todos y cada uno de los procesos que lo integran. Las otras propiedades generales del universo, además de su existencia objetiva, se han puesto al descubierto y se siguen determinando con el avance del conocimiento científico.

Reflexiones a modo de conclusión

Desde que el hombre comenzó a pensar científicamente se han establecido numerosas leyes que explican muchos de los fenómenos naturales y que a su vez también han servido para desarrollar herramientas que pueden aplicarse al conocimiento de las causas o funcionamiento de esos mismos fenómenos o de otros para los que no existía explicación. Este conocimiento es aceptado por todos porque no es posible que cada uno de nosotros compruebe experimentalmente la veracidad de una ley. Sin embargo, recordemos que toda gran hipótesis que se convierte en paradigma por un tiempo es falible y puede ser desplazada por otra cuando se acumulen nuevos conocimientos que muestren sus falencias. Esta situación no es desalentadora. Así se ha movido la ciencia. Porque aunque una hipótesis no sea perfecta promueve el avance científico brindando explicaciones y así sucesivamente hasta que otra hipótesis mejor aparece y hasta que por fin se alcance a la verdad.

Hay un aspecto del conocimiento científico que no podemos dejar de mencionar a nuestros jóvenes lectores. Es cierto que los avances logrados principalmente durante el siglo XX han contribuido al mejoramiento de la calidad de vida pero no olvidemos que paralelamente han sido usados para su destrucción. El sofisticado material bélico ha sido utilizado en guerras de etnias contra etnias, países colonizadores sobre colonizados, ricos contra pobres, fundamentalistas contra todos y todos, en mayor o menor grado, contra la vida vegetal y animal.

Es por el poder intrínseco de destrucción que conllevan algunos conocimientos científicos que todo individuo que se apasione por la investigación, por esa sensación inigualable de estar descubriendo un misterio como el detective más sagaz, debe prometerse como ser humano que no participará en investigaciones destinadas al aniquilamiento de los seres vivos. Esta ética del comportamiento es esencial para ser un buen científico porque es imposible volver atrás pero es posible cambiar.

Pequeño diccionario de la jerga científica

Los científicos se comunican entre sí, en forma oral o escrita, con una mezcla de palabras de uso común y vocablos específicos utilizados para describir un proceso, un elemento o una cualidad especial. Muchos de estos vocablos específicos tienen raíces griegas o latinas adoptadas por el idioma inglés porque los países líderes en investigación son de habla inglesa. Al presente, el inglés es el idioma de la comunicación científica universal, sin desconocer la importancia de poder hablar y entender una lengua que permita comunicarnos con el resto del mundo, la enseñanza en nuestro país se realiza mediante el leguaje español, en su versión rioplatense.

Este diccionario está organizado de la siguiente forma:

- 1) al vocablo seleccionado le sigue la definición que provee la Real Academia Española de la Lengua, como, en general, un término tiene varias acepciones, se seleccionaron las más apropiadas al uso del término en un contexto científico o, dicho de otro modo, en un ambiente científico.
- 2) en algunos casos se muestra una familia de vocablos, es decir, varios vocablos provenientes de una misma raíz, con significados parecidos.
- 3) se proveen ejemplos de su uso en informes o trabajos científicos.

Dado que este primer capítulo trata de temas generales, los términos que se analizarán también lo son. Nota: cuando en el ejemplo se mencionan términos del listado no definidos aún se encuentran subrayados.

Glosario de palabras de carácter general

actualización: ver review más abajo.

análisis 1. Distinción y separación de las partes de un todo hasta llegar a conocer sus principios o elementos. **2.** Examen que se hace de una obra, de un escrito o de cualquier realidad susceptible de estudio intelectual. Ejemplo: *El **análisis** de los resultados obtenidos permite concluir que la reacción no depende de los componentes iónicos presentes.*

conclusión: Fin y terminación de algo. Ejemplo: ver el ejemplo de análisis. Conclusión, o conclusiones, es la parte final de un informe, un trabajo de tesis, un trabajo de investigación, etc., que expresa muy brevemente el hallazgo principal o el corolario de las experiencias realizadas.

consecuencia: Hecho o acontecimiento que se sigue o resulta de otro. Ejemplo:

*En **consecuencia**, los resultados obtenidos prueban inequívocamente la hipótesis de trabajo propuesta.*

control: en todo experimento siempre se agrega un control ver el significado en el capítulo 2 de este curso.

corolario: Proposición que no necesita prueba particular, sino que se deduce fácilmente de lo demostrado antes. Ejemplo: *Como **corolario** de los resultados obtenidos podemos afirmar que una cucaracha tiene siempre apetito.*

deductivo: Que obra o procede por **deducción** (*Fil.* Método por el cual se procede lógicamente de lo universal a lo particular). Ejemplo: *En este trabajo de investigación hemos utilizado el método deductivo.*

dependen: Producirse o ser causado o condicionado por alguien o algo. Ejemplo: *Los resultados obtenidos con la droga **dependen** de la cantidad de virus presente al inicio de la infección.*

dependiente: Que depende. Ejemplo: *La velocidad de la reacción es **dependiente** de la temperatura en el rango de 37°C a 39°C.*

empírico: Perteneciente o relativo a la experiencia. En este caso la definición que da la RAE no se ajusta al significado que se le da en la Ciencia a este término. Un resultado **empírico** es el que se obtiene por experimentación, en contraposición con resultados obtenidos por predicciones teóricas.

específico: Que es propio de algo y lo caracteriza y distingue de otras cosas. Ejemplo: *El método usado no es **específico** ya que no permite distinguir entre las proteínas A y B.*

especular: **1.** Meditar, reflexionar con hondura, teorizar. **2.** Perderse en sutilezas o hipótesis sin base real. Ejemplo: *Esta teoría es puramente especulativa.*

especulativo/a: **1.** Perteneciente o relativo a la especulación.

2. Que procede de la mera especulación o discurso, sin haberse reducido a práctica.

Ejemplo: ver **especular**.

experiencia: Práctica prolongada que proporciona conocimiento o habilidad para hacer algo.

experimental: Fundado en la experiencia, o que se sabe y alcanza por ella. Ejemplo: *Los resultados **experimentales** muestran que la droga X es antiviral en concentraciones no tóxicas para las células.*

experimento: Acción y efecto de experimentar. Ejemplo: *Realizamos los experimentos por duplicado.*

Comentario: Es una costumbre generalizada referirse a los experimentos mediante el término experiencias, pero, si comparamos las definiciones, surge claramente que no quiere decir lo mismo lo mismo que experimento y que su uso es incorrecto.

factor: Elemento, concausa. Ejemplo: *El **factor** determinante del resultado obtenido fue realizar la incubación a 33°C en lugar de 37°C.*

falible: Que puede faltar o fallar. Ejemplo: *Ninguna teoría es **infallible**.*

fenómeno: **1..** Toda manifestación que se hace presente a la consciencia de un sujeto y aparece como objeto de su percepción. **2.** Cosa extraordinaria y sorprendente.

3. Fil. En la filosofía de Immanuel Kant, lo que es objeto de la experiencia sensible.

Comentario: Ninguna de las definiciones por separado completa el significado de **fenómeno**. En términos científicos se suele expresar: es un **fenómeno** de naturaleza química o un **fenómeno** de naturaleza física.

Según mi criterio personal, **fenómeno** en el lenguaje científico es una palabra comodín, casi equivalente a cosa en el lenguaje coloquial, que evita la descripción detallada y repetida de algo fuera de lo común o no explicado aún.

hipótesis Suposición de algo posible o imposible para sacar de ello una consecuencia.

hipótesis de trabajo: La que se establece provisionalmente como base de una investigación que puede confirmar o negar la validez de aquélla. Ejemplo: *Este trabajo de investigación está basado en la hipótesis de que los cuerpos de las galaxias lejanas se mueven con mayor aceleración que los de las galaxias cercanas.*

hipotético: Pertenciente o relativo a la hipótesis o que se funda en ella.

implícito: Incluido en otra cosa sin que ésta lo exprese. Ejemplo: *Queda implícito que los resultados obtenidos son sólo aplicables en condiciones experimentales.*

inducción: Acción y efecto de inducir. Ejemplo: *Mediante un procedimiento inductivo hemos llegado a la conclusión...*

inducir: *Fil.* Extraer, a partir de determinadas observaciones o experiencias particulares, el principio general que en ellas está implícito.

inequívoco: Que no admite duda o equivocación. Ejemplo: *Los resultados obtenidos se consideran inequívocos ya que fueron realizados con un número significativo de muestras.*

irreversible: Que no es reversible. Ejemplo: *A mayor temperatura la reacción es **irreversible**.*

mecanismo: proceso (ver proceso). Ejemplo: *El mecanismo de acción de la droga en ensayo no se conoce.*

modelo: Esquema teórico, generalmente en forma matemática, de un sistema o de una realidad compleja, que se elabora para facilitar su comprensión y el estudio de su comportamiento.

objetivo: 1. *Ópt.* Lente o sistema de lentes de los instrumentos ópticos, colocado en la parte que se dirige hacia el objeto. 2. Desinteresado, desapasionado. Ejemplo: Los resultados de la ciencia experimental son **objetivos** y en su interpretación no debe intervenir la subjetividad del investigador. 3. sinónimo de **objeto**

objeto: Hay varias acepciones, pero elijamos dos: 1. Fin o intento a que se dirige o encamina una acción u operación. 2. Materia o asunto de que se ocupa una ciencia o estudio.

paper o trabajo de investigación: es un trabajo escrito que describe resultados experimentales originales que consta de las siguientes partes: de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión.

parámetro: Dato o factor que se toma como necesario para analizar o valorar una situación. *Mat.* Variable que, en una familia de elementos, sirve para identificar cada uno de ellos mediante su valor numérico.

Comentarios: En general, el uso de la palabra parámetro o parámetros se aplica a mediciones como la temperatura, el pH, etc., equivaldría a las condiciones usadas en una reacción de modo que sirvan para compararla con otra.

postular: 1. Pedir, pretender. 2. Pedir por la calle en una colecta.

postulado: (participio de postular) 1. Proposición cuya verdad se admite sin pruebas y que es necesaria para servir de base en ulteriores razonamientos. Comentario: No hay explicación porque el participio tiene un significado diferente de postular. En realidad, ambos términos son de uso habitual en ciencia y con el significado de **postulado**.

proceso: Conjunto de las fases sucesivas de un fenómeno natural o de una operación artificial. Ejemplo: *En el proceso se ganan dos moléculas de H y se gana una de O.*

proponer: Hacer una propuesta. Ejemplo: *Los resultados permiten proponer la hipótesis siguiente ...*

propuesta: Proposición o idea que se manifiesta y ofrece a alguien para un fin.

reacción: *Biol.* Acción del organismo que trata de contrarrestar la influencia de un agente patógeno. *Quím.* Transformación de unos compuestos químicos en otros.

Ejemplos: La **reacción** cutánea se debió a la intoxicación. La **reacción** de algunos elementos con el oxígeno del aire es explosiva.

reactivos: 1. Que produce reacción. 2. *Quím.* Sustancia empleada para descubrir y valorar la presencia de otra, con la que reacciona de forma peculiar. Ejemplo: *Los reactivos usados estaban vencidos.*

referencia. En un escrito, indicación del lugar de él mismo o de otro al que se remite al lector. **Comentario:** al final de cada trabajo de investigación figura una sección con el título de Referencias, allí se consignan todos los trabajos citados y teóricamente leídos que permitieron con su información la realización del trabajo reportado.

relación: Conexión, correspondencia de algo con otra cosa específica.

Ejemplo: En **relación** con los datos reportados en este trabajo podemos afirmar que es la primera vez que se aplican a los mamíferos.

resumen: 1. Acción y efecto de resumir o resumirse. 2. Exposición resumida en un asunto o materia.

Ejemplo: En resumen: de los datos obtenidos podemos concluir que las ratas permanecen en actividad 16 horas por día.

resumir: Reducir a términos breves y precisos, o considerar tan solo y repetir abreviadamente lo esencial de un asunto o materia.

reversible: Que puede volver a un estado o condición anterior. *Fís. y Quím.* Se dice del proceso ideal que cambia de sentido al alterarse en muy pequeña proporción las causas que lo originan. Ejemplo: La entrada de los virus a las células es **reversible** si tiene lugar a una temperatura menor de 37°C.

review o revisión: trabajo de investigación escrito que consiste en actualizar el conocimiento sobre un tema en particular. Puede abarcar el conocimiento completo o tomar los últimos años. Su longitus y división es variable.

significativo: Que da a entender o conocer con precisión algo. **Comentario:** generalmente el término **significativo** se utiliza cuando a los resultados obtenidos se le aplican métodos estadísticos que le dan validez.

similar: Que tiene semejanza o analogía con algo. Ejemplo: El tratamiento de los cultivos control fue **similar** a los tratados excepto que no contenían la droga. Se puede poner otra palabra en lugar de tratados?

síntesis: Suma y compendio de una materia u otra cosa. *Quím.* Proceso de obtención de un compuesto a partir de sustancias más sencillas. En la jerga científica, resumen y **síntesis** se usan indistintamente.

sistemático 1. Que sigue o se ajusta a un sistema. 2. Dicho de una persona: Que procede por principios, y con rigidez en su tenor de vida o en sus escritos, opiniones, etc. 3. *Biol.* Estudio de la clasificación de las especies con arreglo a su historia evolutiva o filogenia. Ejemplo: La búsqueda **sistemática** de los parámetros involucrados en la reacción dio resultados negativos.

subjetivo: 1. Perteneciente o relativo al sujeto, considerado en oposición al mundo externo. 2. Perteneciente o relativo a nuestro modo de pensar o de sentir, y no al objeto en sí mismo.

variable: *Mat.* Magnitud que puede tener un valor cualquiera de los comprendidos en un conjunto. Comentario: las variables de una reacción se refieren a los cambios de temperatura, presión, concentración iónica y otros.

~ **estadística:** *Mat.* Magnitud cuyos valores están determinados por las leyes de probabilidad, como los puntos resultantes de la tirada de un dado.

Capítulo 2. El blanco y el control

El conocimiento de las Ciencias experimentales se construye en base a teorías cuya veracidad requiere de pruebas de experimentación. Pero aunque no tengamos el privilegio de proponer al mundo una teoría nueva, seguramente todos aquellos que se asoman al campo experimental deben saber, en primer lugar, que para otorgarle validez a los hallazgos que realicen deben cumplir obligatoriamente con algunos requisitos. Entre estos requisitos es fundamental incluir en cada experimento, cualquiera sea su naturaleza, un blanco o control, para poder otorgar validez al resultado obtenido.

BLANCO y CONTROL no parecen sinónimos

Aunque en el fondo tienen la misma función el blanco o el control no son siempre equivalentes, en general la denominación de **blanco** se reserva para las reacciones químicas y el **control** tiene carácter más universal y debe ser incluido en todo tipo de experimentos.

La presencia de los controles es necesaria no sólo en los experimentos cualitativos sino también en los cuantitativos. Entendemos por **cualitativos** cuando esperamos una respuesta de **todo o nada, hay o no hay, existe o no existe**, sin importarnos la cantidad, dicho en otros términos, la respuesta es **negativa o positiva**. En cambio, en un experimento **cuantitativo** queremos medir la cantidad de los que estamos buscando en una muestra. Por ejemplo: cuántos gramos de algo, cuántos tubos dan positivos, cuántos animales mueren por efecto de una droga, cuántas células hay en un cultivo, cuántas partículas de metal hay en una solución, cuántas bacterias hay en una gota de agua limpia, etc.

Los valores cuantitativos se aplican generalmente cuando se quiere comparar entre muestras incógnitas o contra una muestra estándar. Pero este concepto lo estudiaremos en otro capítulo de esta serie.

Con los siguientes ejemplos trataremos de aclarar qué significa un blanco o un control:

Caso 1. Blanco Se desea conocer la presencia de un metal en una muestra de agua (puede ser cobre, hierro, cadmio u otro). Se sabe que hay un reactivo (se denomina así a un compuesto químico o mezcla de compuestos químicos que reaccionan con el metal en cuestión) que al mezclarlo con el metal produce un color. **Elijamos el azul**. La intensidad del color de la solución (metal + reactivo) dependerá de la cantidad de metal presente en la muestra, a mayor cantidad más intensidad tendrá el color azul.

Para medir la intensidad del color, que nos dará una medida de la cantidad de metal presente en la muestra, utilizaremos un aparato llamado colorímetro o uno más perfeccionado como un espectrofotómetro. **¿En qué consiste la lectura?** Colocando nuestro tubo de ensayo (conteniendo reactivo + la muestra) en el aparato conseguiremos que una luz atraviese la solución y que sea recibida por un "sensor" que la convertirá en una medida relacionada con la facilidad con que el rayo de luz pueda atravesar la solución. La idea es simple:

cuanto más oscura sea la solución dejará pasar menos luz y en consecuencia nos indicará la presencia del metal.

El sensor leerá un valor menor que si en el trayecto de la luz hubiéramos puesto un tubo lleno de agua incolora y transparente.

¿Para qué necesito un blanco?

Para que la lectura de estos aparatos tenga lugar, primero hay que calibrarlos con una muestra de agua, es decir el agua sirve de valor de referencia, pero... todo no termina ahí.

¿Qué pasa cuando nuestro reactivo es ligeramente coloreado?. La medición final será igual a la suma de:

a) color de reactivo + color de reactivo más metal con lo que obtendremos una medición falsa, porque nuestra incógnita se comparó contra agua que es transparente.

Lo correcto es preparar un blanco o control que contenga todos los ingredientes de la reacción menos el metal. Este blanco medido contra el agua nos dará un cierto valor positivo que tendremos en cuenta en el cálculo final.

El resultado correcto será:

b) color de la muestra – color del blanco (control) = lectura incógnita.

¡Ahora sí!, este valor expresa la verdadera cantidad de metal presente en la muestra.

En este caso y en casos similares, el uso del control evita obtener mediciones erróneas por exceso, al no tener en cuenta el aporte que hacen al sistema, los reactivos.

Caso 2. Control

Nos proponemos encontrar una droga que impida el crecimiento (división) celular con la esperanza de descubrir un compuesto farmacológico que eventualmente pudiera usarse contra el cáncer. Antes de realizar una prueba en animales debemos probar la droga en un sistema celular en el laboratorio.

Es posible mantener células vivas en recipientes de plástico o vidrio, en los que las células se adhieren a la superficie (cultivo en monocapa), o en suspensión, flotando en el medio de cultivo. Estos medios de cultivo son soluciones complejas que contienen sales apropiadas así como nutrientes necesarios para alimentar a las células. En los laboratorios de cultivos celulares se dispone de unas placas de plástico estériles (libres de gérmenes) en donde se pueden depositar (sembrar) un número apropiado de células. Las células cuando son incubadas (mantenidas) en ese medio alimenticio y a 37° C se dividen, creciendo su número en forma logarítmica hasta que se agotan los nutrientes. Existen varios métodos para contar el número de células vivas. Por eso si deseo probar una droga puedo agregarla al medio de cultivo y comparando con un **control** podré determinar su efectividad o no.

Veamos el siguiente ejemplo:

Se desea probar el efecto de una droga **X** y de otra **Y** sobre el crecimiento celular para ello se siembran en un recipiente 3×10^5 (300.000) células y se incuba por tres días con medio nutritivo (**Serie C**).

En forma similar otro recipiente se siembra con igual número de células y se le agrega medio nutritivo conteniendo droga **X**, se incuba por tres días (**serie A**).

Por último, un tercer recipiente se siembra con igual número de células y luego se incuba con medio nutritivo conteniendo la droga **Y**, también se incuba por tres días (**serie B**). Pasado ese tiempo se cuenta el número de células de las series **A**, **B** y **C** y se obtienen los siguientes resultados:

Serie	Número de células por recipiente después de tres días de sembradas
C (control)	3×10^6 (30.000.000)
A (droga X)	3×10^5 (300.000)
B (droga Y)	3×10^2 (300)

¿Cómo interpretamos estos resultados?

Es evidente la importancia fundamental del control, si comparamos el número de células sembradas 3×10^5 (300.000) con las existentes al día tercero después de la siembra concluimos que se han incrementado aproximadamente **100 veces**

La droga **X** no les permitió dividirse, ya que al día 3ro. el número de células es idéntico a las sembradas. Podemos concluir que se trata de un **citotástico** (detuvo el crecimiento celular).

La droga **Y** es mejor aún que la **X** porque no sólo es **citostática**, sino también **citotóxica**, ya que respecto del valor inicial, el número de células, se redujo mil veces.

El experimento se puede analizar también de otra forma, pero resulta más que evidente **el papel fundamental del control** sin el cual no podría arribarse a ninguna conclusión.

Caso 3. Control o blanco

A pesar de que por razones de Bioseguridad cada vez más el uso de isótopos radiactivos decrece, a veces, es necesario utilizar isótopos radiactivos para poder determinar el papel que juegan algunas moléculas en los procesos metabólicos de las células.

Los isótopos radiactivos de mayor uso en experimentos biológicos son el fósforo ^{32}P , carbono ^{14}C , tritio (^3H) y azufre ^{35}S . Recordemos que estos átomos son variantes inestables del isótopo más común estable, estos átomos para estabilizarse pierden electrones en forma de radiación electromagnética.

Para medir la emisión de las radiaciones (una forma indirecta de conocer la cantidad de sustancia que tengo) se utiliza entre otros aparatos el **“espectrofotómetro de centelleo”** más conocido en la jerga del laboratorio como centellador. Este aparato permite alojar frascos de diferente tamaño en los que se coloca la muestra radiactiva disuelta en una solución “centelladora”. Esta solución no es más que la mezcla de dos solventes orgánicos cuyos átomos al ser bombardeados por los electrones emiten **“fotones”** (partículas o cuantos de luz). Los fotones, a su vez, son convertidos en el espectrofotómetro en impulsos eléctricos que activan un contador luminoso que registra el número de desintegraciones por minuto. La desintegración de los átomos no es un fenómeno continuo sino que el número de pulsos por minuto resulta del promedio de desintegraciones que se realizan al azar. **¿Y el control, se preguntarán Uds.?**

Aquí también es necesario un control. Siempre en el medio ambiente se producen radiaciones naturales que son registradas por el aparato y también intervienen otros factores como el tamaño de la muestra, la cantidad de líquido, el tipo de aparato y otras variables más complejas de explicar. El hecho es que nuestra muestra debe ir acompañada de otra **muestra blanco que contenga, en un envase similar, el líquido de centelleo sin la muestra.**

Para obtener el resultado se debe proceder así: a la lectura de desintegraciones por minuto conocidas como **cpm** (cuentas por minuto) hay que restarle las **cpm** del fondo. Es decir el valor de radiactividad del medio ambiente.

El valor que se obtiene no afecta demasiado los resultados si el número de **cpm** de la muestra que se cuenta es alto, por el contrario si las muestras emiten un número bajo de cuentas, ese valor influye en la reproducibilidad de los resultados.

Cualquiera sea el caso la presencia de la muestra blanco estará indicando la validez del experimento. Porque no sería raro que por accidente, se hubiera contaminado el solvente usado con material radiactivo y si no incluimos el blanco nuestra lectura podría resultar errónea. Siempre se tiene idea del valor del blanco o “background” (radioactividad base) de ser el blanco muy alto está indicando que algo incorrecto ha ocurrido.

Caso 4.

Los experimentos que se realizan con animales son muy frecuentes, aunque hay una tendencia a evitar su uso por razones humanitarias y reemplazarlos por otros sistemas.

Sin embargo, muchas veces son un paso indispensable antes de realizar ensayos en el hombre.

Hay muchos tipos de experimentos que se pueden realizar con animales, en especial, ratones que por su pequeño tamaño son más manejables que las ratas. Por otro lado, la experiencia acumulada en la Ciencia biológica a través de tanto años de experimentación indica que los resultados obtenidos en ratones son de inmediata aplicación al hombre.

Existen además, ratones **endocriados** (obtenidos por cruzamiento entre ratones familiares) y libres de gérmenes, de modo de evitar que el resultado de un experimento sea complicado por la participación de microorganismos ajenos a la experimentación.

Vamos a describir el caso de un experimento en el que se desea conocer el efecto de la infección con un agente patógeno en el ratón.

En primer lugar, debemos trabajar con un número relativamente grande de animales, por ejemplo **10**, para que los resultados que se obtengan sean significativos. La noción de **significación** la estudiaremos en otro capítulo, para el ejemplo que daremos no es necesario conocer su importancia.

El protocolo (así se denomina al esquema o diseño de un experimento) será el siguiente:

Serie A. 10 ratones (de determinada edad o peso) serán inoculados con una cantidad conocida del agente patógeno y se mantendrán en observación durante 30 días, alimentándolos diariamente y con toda la cantidad de agua necesaria para beber a su disposición (*ad libitum*). Todos los días serán revisados y se registrará el número de enfermos o muertos. Como dato final se tendrá en cuenta la **mortalidad** (número total de muertos) y la **morbilidad** (número total de enfermos).

Serie B 10 ratones similares serán inoculados con la solución en la que estaba suspendido el agente patógeno pero sin el agente (**placebo**). **Cuando se prueban medicamentos en seres humanos siempre se dividen en dos grupos a uno se le administra el medicamento y al otro placebo, agua u otro vehículo sin el medicamento, porque lo que interesa es compara el efecto de la droga sobre reacciones naturales cuyo beneficio se podría atribuir al medicamento).**

Estos animales serán observados del mismo modo que la serie A y constituye el grupo de animales **controles**. En el siguiente cuadro se analizan los resultados de tres experimentos hipotéticos.

Serie	Número de animales enfermos	Morbilidad % (porcentaje)	Número de animales muertos	Mortalidad % (porcentaje)
Experimento 1				
A	10	100	10	100
B (control)	2	20	0	0
Experimento 2				
A	10	100	10	100
B (control)	9	90	9	90
Experimento 3				
A	2	20	0	0
B (control)	0	0	0	0

Analicemos los resultados:

Experimento 1. Es altamente probable que los ratones sean muy susceptibles al agente patógeno. Como los 2 enfermos del control se recuperaron podría ocurrir que estuvieron enfermos porque no eran completamente sanos al inicio del experimento y las condiciones de estrés producido por la observación diaria les produjo síntomas. De todos modos la observación de la enfermedad es muchas veces subjetiva mientras que la muerte es una reacción incuestionable.

Experimento 2 La similitud de comportamiento entre los inoculados con el agente patógeno y el placebo hacen pensar que los animales murieron por causas ajenas al patógeno inoculado.

Experimento 3. Aquí podemos concluir que estos animales no son susceptibles al agente patógeno, valen las observaciones sobre la enfermedad efectuadas antes.

¿Qué habría sido de nuestro experimento número 2 de no haber incluido un grupo control?. Hubiéramos arribado a conclusiones falsas y cuál es la importancia en los otros, aseverar que la interpretación de los resultados es correcta.

Conclusión: Hemos presentado aquí varios ejemplos del papel que el blanco o control juega en la interpretación de resultados experimentales, es la forma de validar que un solo componente presente es el desencadenante de una respuesta. Por lo temprano de estas clases no quisiera polemizar sobre algunos factores que a veces entorpecen esta conclusión.

Capítulo 3. Las curvas patrón.

En el **capítulo 2** nos hemos referido a la importancia del uso de un blanco o control para darle validez al resultado de un experimento. Hemos explicado también que el resultado de una experiencia puede ser de tipo cualitativo o cuantitativo. En este capítulo aprenderemos algunas formas de expresar los resultados en forma cuantitativa mediante la elaboración de una **curva patrón**.

Nociones previas

Curvas dosis-respuesta.

Existe una relación entre la magnitud (se refiere al tamaño) de una respuesta y la cantidad del elemento que la provoca. Por ejemplo: si la presencia de 10 mg de cobre en una solución agregada a una mezcla reactiva genera la aparición de un color azul pálido, la presencia de 20 mg de cobre dará lugar a que la solución reactiva se torne azul oscuro. Dicho de otro modo: la intensidad del color azul dependerá de la cantidad de cobre presente en la solución, esta situación así planteada se puede interpretar de este modo: **a mayor cantidad de cobre mayor respuesta**. Efectivamente: si voy incrementando la cantidad de cobre de la

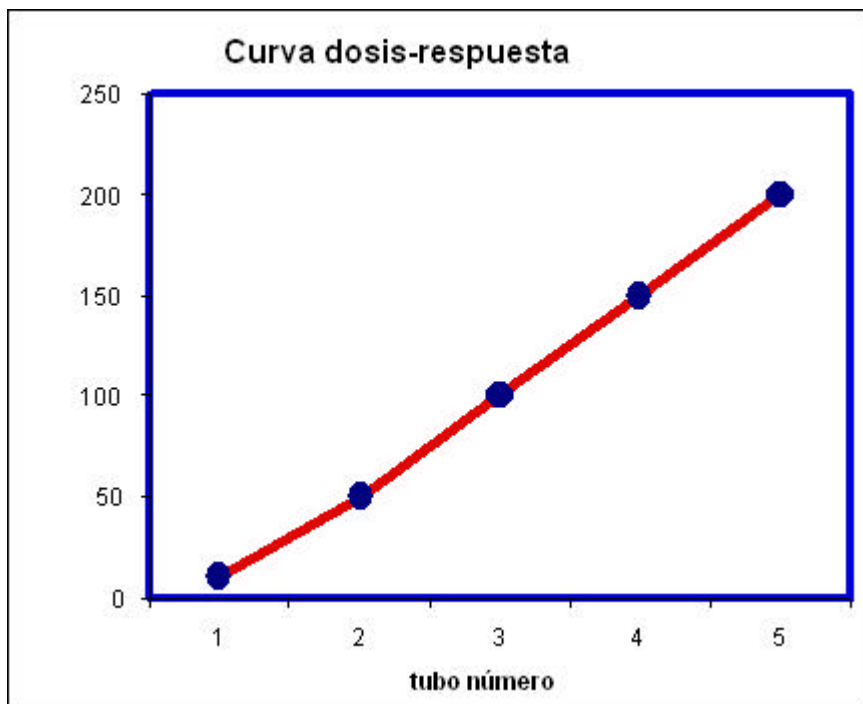
siguiente forma 1 mg (tubo 1) , 5 mg (tubo2), 10 mg(tubo3) , 15 mg (tubo 4) y 20 mg(tubo5), la intensidad del color será:

Cuadro 1.

Tubo número	Número de veces que se incrementó el color respecto al tubo 1.
1	1
2	5
3	10
4	15
5	20

Como podemos apreciar hay una correlación entre la cantidad del elemento reactivo y la respuesta que provoca. A mayor cantidad de elemento reactivo mayor respuesta, lo interesante es que hay una relación proporcional a la cantidad de elemento presente. Esta relación se puede graficar en forma de curva que se conoce con el nombre de curva de **dosis-respuesta**, la curva- dosis respuesta ideal es aquella que responde en forma lineal, a cada incremento en el eje **X** (abscisa) le corresponde un incremento proporcional en el valor correspondiente expresado sobre el eje de las **Y** (ordenada). Lo que significa que a medida que aumenta la cantidad del cobre aumenta el color en forma proporcional.

Figura 1.



DO (densidad óptica).

En el Cuadro 2 vamos a expresar los datos que se deducen de la figura 1, así en este ejemplo ideal vemos que:

Cuadro 2.

Tubo (número)	Cantidad de cobre en la muestra (mg)	Lectura en unidades arbitrarias de DO
1	1	10
2	5	50
3	10	100
4	15	150
5	20	200

Para cada valor de cantidad de cobre (más correctamente concentración) corresponde una lectura de DO de **10 veces más o 10 x**.

Cuando se trabaja con datos reales las curvas que se obtienen no son tan ideales y responden aproximadamente a lo esperado, pero esta situación no es un obstáculo ya que dentro de **ciertos valores es**

posible trazar la recta más probable que una serie de puntos, con el uso de los programas de cálculo de las computadoras esta operación es muy fácil de realizar.

Las curvas dosis-respuesta brindan al investigador la seguridad que un fenómeno que están midiendo es **específico**, es decir: que el efecto que se mide es producido por el agente o compuesto que se está estudiando. Puesto que si aumentamos o disminuimos este agente se aumenta o disminuye la respuesta.

Hay que advertir que una respuesta lineal no se obtiene con un rango amplio de concentraciones sino dentro de un conjunto de valores estrechos que dependen de numerosos factores dependientes del método de medición. Por otra parte, este tipo de curvas no se limita solamente a la determinación de un compuesto químico sino que tiene múltiples aplicaciones.

Diluciones

Cuando se decide determinar la cantidad de cobre presente en una muestra tenemos necesariamente que recurrir a la preparación de diluciones. Primero vamos a explicar qué es una solución y luego pasaremos a las diluciones. El cobre forma sales por ejemplo con el sulfato (se combinan el azufre, el oxígeno y el cobre), el sulfato de cobre tiene estado sólido, es de color azul y se lo puede encontrar en los negocios de ventas de plantas ya que es necesario, a veces, para favorecer el crecimiento de algunas plantas. Como muchas sustancias sólidas cristalinas el sulfato de cobre (SO_4Cu_2) se disuelve en agua, dicho de otro modo es soluble en agua, se forma entonces una solución cuando colocamos por ejemplo 1 gr de sulfato de cobre en 100 ml de agua (solución A). Se dice que la concentración de sulfato de cobre en la solución A es de 10gr/l o lo que es lo mismo que se trata de una solución al 1%.

¿Cómo se procedió a preparar la serie de tubos conteniendo sulfato de cobre que vimos antes?.

1. Se preparó una solución concentrada
2. A partir de esa solución se realizaron diluciones apropiadas.

¿Qué es diluir?

Diluir es agregar más agua (solvente) a una solución de modo de tener una concentración menor de sólido (solute)/ litro. En general según el propósito se preparan soluciones que se expresan en mg/ml. Así por ejemplo, si preparo 10 ml de una solución que contiene una concentración de sulfato de cobre de 50 mg/ml (solución B) podré preparar a partir de ella las siguientes soluciones por dilución:

- a. 1ml de solución B + 9 ml de agua= una solución de 5 mg/ml (dilución 1:10)
- b. 5 ml de la solución B + 5 ml de agua= una solución de 25 mg /ml (dilución 1:2).

En general se parte de una solución concentrada y se preparan series de diluciones al décimo (1:10) o al medio (1:2). De esta manera se obtiene una serie de soluciones relacionadas por ejemplo por un factor de dilución 10 es decir 1/10; 1/100; 1/1000 y así sucesivamente. O la otra serie es 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 etc. siendo el factor de dilución al medio.

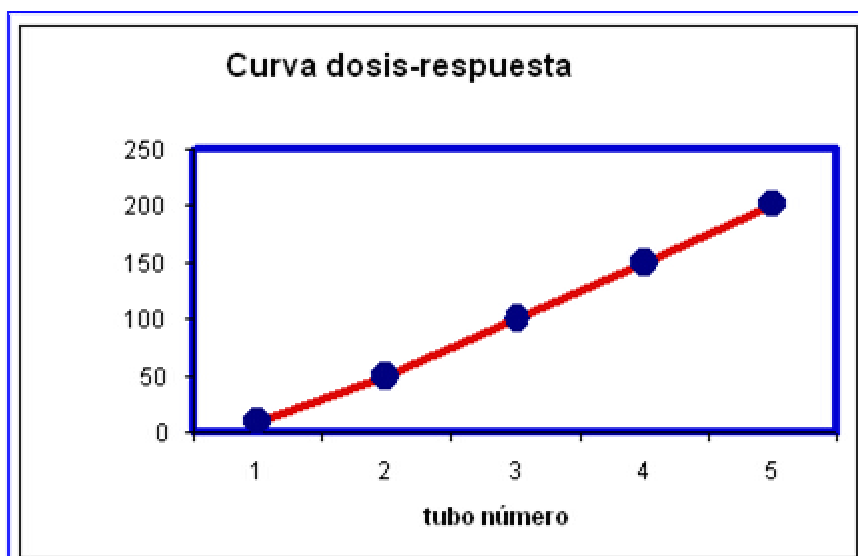
¿Qué se entiende por curva patrón?

Se trata de una curva de referencia construida con cantidades conocidas de cobre (por ejemplo en mg) que se utilizará para determinar la cantidad de cobre presente en una muestra incógnita. Para realizar la experiencia debemos preparar una solución de una sal de cobre y realizar diferentes diluciones de modo de disponer, por lo menos de 4 o 5 concentraciones, luego realizaremos la reacción química correspondiente y mediremos la DO de cada solución, así vamos a construir una curva dosis-respuesta que en este caso será nuestra curva patrón de referencia.

Vamos a asumir que nuestra curva patrón es como la de la **figura 1**, cada vez que se necesite conocer la cantidad de cobre presente en una muestra una vez que se realiza la reacción y se lee la DO se procede a trazar una línea desde el valor del eje **Y** hasta intersectar la curva y luego desde el punto de intersección se baja una recta hasta **X**, como en este eje se conocen las concentraciones expresadas en mg podremos conocer cuánto cobre había en nuestra muestra.

En la **figura 2** se presenta un ejemplo hipotético en el que la lectura de DO corresponde a un valor de 125, la línea de intersección con el eje **X** nos dice que la muestra tiene una cantidad de cobre equivalente a 12,5 mg ya que el punto cae equidistante entre los valores correspondientes a los tubos 3 y 4 conteniendo 10 y 15 mg de cobre respectivamente.

Figura 2.



Conclusiones:

Como corolario de los Capítulos 1, 2 y 3 de este e-curso de "Introducción a la investigación científica experimental" vemos que la validez de los resultados de un experimento dependen fundamentalmente de su especificidad. Para ello es necesario utilizar controles apropiados y someter al sistema a cambios de concentración regulados de tal modo que la respuesta sea proporcional al incremento del elemento incógnita en cuestión. Siempre que se trabaja en determinadas condiciones (en este caso concentraciones) puede ocurrir que para concentraciones más altas o muy bajas la respuesta no sea lineal.

Este tipo de curvas dosis respuesta es aplicable también a otro tipo de experiencias como ser inactivar una sustancia por la acción de rayos ultravioleta o radiación, en este caso la dosis se relaciona con la intensidad y el tiempo de irradiación.

Capítulo 4. Soluciones molares

En el **capítulo 3** de esta serie hemos explicado la forma cómo se preparan soluciones de distintas concentraciones de una sustancia sólida (**preparando diluciones**) y hemos introducido además el uso de las curvas de calibración. Sin embargo, cuando explicamos las diluciones adquirimos la idea de la **relatividad** de una solución respecto de otra, nos falta conocer el modo cómo se expresa la concentración real (no relativa) de una sustancia sólida (solute) en una solución. Ya sabemos que la concentración de una sustancia se expresa en unidades de peso (generalmente en gr o mgr). sin embargo, hay otras formas de expresar la concentración de una sustancia en una solución calculando su **MOLARIDAD (M)**, este concepto es el que describiremos a continuación.

Soluciones.

Cuando mezclamos una cierta cantidad de un sólido con un líquido se forma una **solución** en la que el sólido se conoce como **solute** y el líquido o **solvente** es el **diluyente**. Ejemplos de soluciones no sólo se encuentran en el laboratorio también en la cocina cuando agregamos sal al agua para preparar luego una sopa estamos preparando primero una solución.

En realidad ¿Qué es una **solución**? Una **solución** es una mezcla homogénea donde todas las partículas que existen en ella se encuentran como moléculas o iones individuales.

Como fácilmente podemos deducir de los ejemplos del capítulo 2 las soluciones se expresan en mgr/ml o en gr/l pero también en molaridad (M).

¿Qué es la molaridad?

El mol (molécula gramo) es una Unidad Internacional usada para medir la cantidad de una sustancia. Un mol de una sustancia expresado en gr es su peso molecular así por ejemplo: un mol de cloruro de sodio (NaCl) son 58,5 gr . Por lo tanto, una solución 1M de cloruro de sodio contendrá 58,5 gr de sal por litro de agua.

La **molaridad** de una solución se calcula dividiendo los moles del soluto por los litros de la solución.

$$\text{molaridad} = \text{moles de soluto/litros de solución}$$

Ejemplo 1: ¿Cuál es la molaridad de 0,75 moles de soluto disueltos en 2,5 L de solvente?.

$$M = 0,75 \text{ mol} / 2,5 \text{ L} = \mathbf{0,3 \text{ M}}$$

Ejemplo 2: ¿Cuál es la molaridad de 58,5 gr de cloruro de sodio disueltos en 2 litros de solvente?.

Para poder hacer el cálculo tenemos que convertir gramos a moles. Si consideramos que el peso molecular del cloruro de sodio es: 58,5 [(peso del Cl⁻ (35,5) + peso del Na⁺(23)] entonces esa cantidad es un mol.

$$M = 1 \text{ M} / 2\text{L} = 0,5 \text{ M}$$

El número de Avogadro

Los cálculos realizados hasta aquí son muy fáciles, el problema se plantea cuando no se dispone de la cantidad de gramos de un soluto equivalente a su peso molecular. Entonces recurrimos al número de avogadro.

Amedeo Avogadro (1776-1856) era un físico italiano que acuñó el término molécula para designar a los pequeños conjuntos estables en que se combinan los átomos y así consiguió diferenciar molécula de átomo. En 1881 dió a conocer un enunciado conocido por la posteridad como principio de Avogadro:

“ Volúmenes iguales de gases cualesquiera, en iguales condiciones de presión y temperatura, contienen el mismo número de moléculas”.

El concepto de mol se introdujo años después de la muerte de Avogadro. Dado que un mol de cualquier sustancia expresado en gramos contiene el mismo número de moléculas, de acuerdo con el principio de Avogadro los volúmenes molares de todos los gases deben ser los mismos.

El número de moléculas contenido en un mol es igual al número de Avogadro cuyo valor se ha calculado en:

$$6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}$$

lo que equivale al número siguiente:

$$602.000.000.000.000.000.000$$

Hagamos un pequeño esfuerzo y recordemos las siguientes ecuaciones:

1.
$$\frac{\text{gramos}}{\text{peso molecular}} = \text{moles}$$

2.
$$\frac{\text{moles}}{\text{volumen}} = \text{molaridad (M)}$$

3.
$$\text{Molaridad (M)} \times \text{Volumen (V)} = \frac{\text{gramos}}{\text{peso molecular}}$$

Para llegar a la **ecuación 3** se ve claramente que fuimos reemplazando los términos.

Ejemplos *

Número 1.

2 gr de NaCl (de peso molecular 58,44 g mol⁻¹ **ojo que pusimos aquí el valor exacto del peso a diferencia y no el aproximado de 58,5**) se disuelven en 100 mL de agua ¿Cuál es la molaridad de la solución?.

Si aplicamos la ecuación 3 tenemos:

$$M \times 0,1 \text{ L} = \frac{2 \text{ gr}}{58,44 \text{ gr.mol}^{-1}}$$

$$M \times 0,1 \text{ L} = 0,034 \text{ mol}$$

$$M = 0,034 \text{ mol} / 0,1 \text{ L}$$

$$M = 0,34 \quad \text{La molaridad de la solución es } \mathbf{0,34 \text{ M}}$$

Número 2.

¿Cuántos gramos de NaCl son necesarios para obtener 500 ml de una solución 0,2 M?.

Si aplicamos la ecuación 3 tenemos:

$$(0,2 \text{ M}) (0,5 \text{ L}) = \frac{x}{58,44}$$

$$0,1 = \frac{x}{58,44}$$

$$X = \text{cantidad} = 5,844 \text{ gr de cloruro de sodio}$$

Por último recordemos que:

Los moles son una medida de la cantidad de una sustancia

La molaridad es una medida de la concentración de esa sustancia, es decir la cantidad de moles por unidad de volumen (litros).

La molaridad es una forma más cabal de comparar concentraciones de diferentes sustancias.

- Ejemplos tomados de [Maths & Computers for Biologists](#): Molarities & Dilutions. Curso de Microbiología de la Universidad de Leicester. Inglaterra.

Capítulo 5. Unidades de uso común en las ciencias experimentales

Introducción

Es necesario conocer el significado de las unidades de medición para entender la importancia de los resultados de los experimentos y expresarlos además correctamente.

En este capítulo hemos realizado una selección de las unidades de uso común en química y biología sin pretender abarcar todo el espectro de unidades conocidas como se encuentra detalladamente en el diccionario de Russ Rowlett de la Universidad de North Carolina de Chapel Hill, Estados Unidos y en la Wikipedia de acceso libre por Internet. Debe quedar claro que si bien nuestro objetivo es brindar información útil y básica, no vamos a definir cada término utilizado ya que consideramos que todos aquellos interesados en asomarse a los principios de la investigación experimental han aprobado ya cursos elementales de Física y Química.

El sistema internacional de unidades (SI)

Se imaginan qué confusión habría en el mundo si no existiera un sistema único de unidades. A pesar que algunos países persisten en el uso de otro tipo de medidas, este acuerdo multinacional permite comparar resultados científicos pero también es fundamental para la vida diaria. Miles de personas tenemos internalizados en nuestro cerebro la noción de metro, de un kilogramo, de un kilómetro, etc., como si todos habláramos un idioma universal. Si nos ponemos a reflexionar, conociendo las mediciones podemos conocer, por ejemplo, la gravedad de un hecho. Así un choque entre dos autos a 40 Km por hora no impresiona como otro a 150 Km por hora, porque no tiene las mismas consecuencias. A poco que pensemos un rato encontraremos decenas de ejemplos. En la ciencia pasa lo mismo una vez que nos familiarizamos con las unidades de medida más comprendemos algunos fenómenos.

Todos los sistemas de medidas se interrelacionan mediante una red de acuerdos internacionales conocida como **International System of Units**, este sistema internacional se denomina **SI** porque usa las dos primeras iniciales del nombre francés **Système International d'Unités**, este tratado fundamental se firmó en París, Francia, el 20 de mayo de 1875. Han adherido al mismo 48 naciones incluidas las naciones más industrializadas.

El Buró Internacional de Pesas y medidas se ocupa de mantener al día el **SI** mediante las conferencias internacionales que se realizan regularmente a las que asisten representantes industriales de todos los países miembros, científicos e ingenieros. La próxima reunión tendrá lugar en el año 2007. Los interesados pueden consultar el sitio web de **BIPM**, for *Bureau International des Poids et Mesures*)

Definiciones

La **dimensión** es una cualidad abstracta de medida sin escala (por ejemplo la longitud).

Una **unidad** es un número que especifica una escala acordada previa (por ejemplo: metros).

Hay cuatro dimensiones fundamentales:

longitud / **tiempo** / **masa** / **carga eléctrica**

El sistema internacional de unidades (1960) se basa en siete unidades principales que se definen en forma absoluta es decir: **sin referencia a las otras**. Estas unidades se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1.

Categoría	Nombre	Abreviatura	Definición
Longitud	metro	m	La distancia que viaja la luz en el vacío en una fracción de $1/299792458$ segundo
Masa	kilogramo	kg	La masa de un prototipo internacional con forma de cilindro formado de platino e iridio que se mantiene en Sevres, Francia.
Tiempo	segundo	s	El tiempo en que transcurren 9192631770 períodos de vibración del átomo de cesio Cs ¹³³ .
Corriente eléctrica	ampère	A	Es la corriente que produce una fuerza específica entre dos alambres paralelos que están a 1 metro de distancia en vacío.
Temperatura	kelvin	K	Es $1/273.16$ de la temperatura termodinámica del punto triple del agua.
Cantidad de sustancia	molécula	mol	La cantidad de una sustancia que contiene tantas unidades elementales como átomos hay en 0,012 kg de C ¹²
Intensidad de la luminosidad	candela	cd	La intensidad de una fuente de luz de una dada frecuencia que da una cantidad específica de potencia en determinada dirección.

Sistema de longitud.

El **metro** es la unidad de **longitud** del **Sistema Métrico Decimal**.

Un **metro** se define como la **distancia** que viaja la **luz** en el **vacío** en 1/299.792.458 **segundos**. Esta norma fue adoptada en **1983** cuando la velocidad de la luz en el vacío fue definida exactamente como 299.792.458 **m/s**.

[Múltiplos del metro:

- * Exámetro (Em): 10^{18} metros.
- * Pentámetro (Pm): 10^{15} metros.
- * Terámetro (Tm): 10^{12} metros.
- * Gigámetro (Gm): 10^9 metros.
- * Megámetro (Mm): 10^6 metros.
- * Kilómetro (km): 10^3 metros.
- * Hectómetro (hm): 10^2 metros.
- * Decámetro (dam): 10^1 metros.

Recordemos que al número 10 hay que agregarle tantos ceros como indica el número de la potencia para darnos una idea de la magnitud de estas unidades.

De todos modos hay que señalar que estas unidades mayores al metro no se utilizan en las ciencias biológicas experimentales.

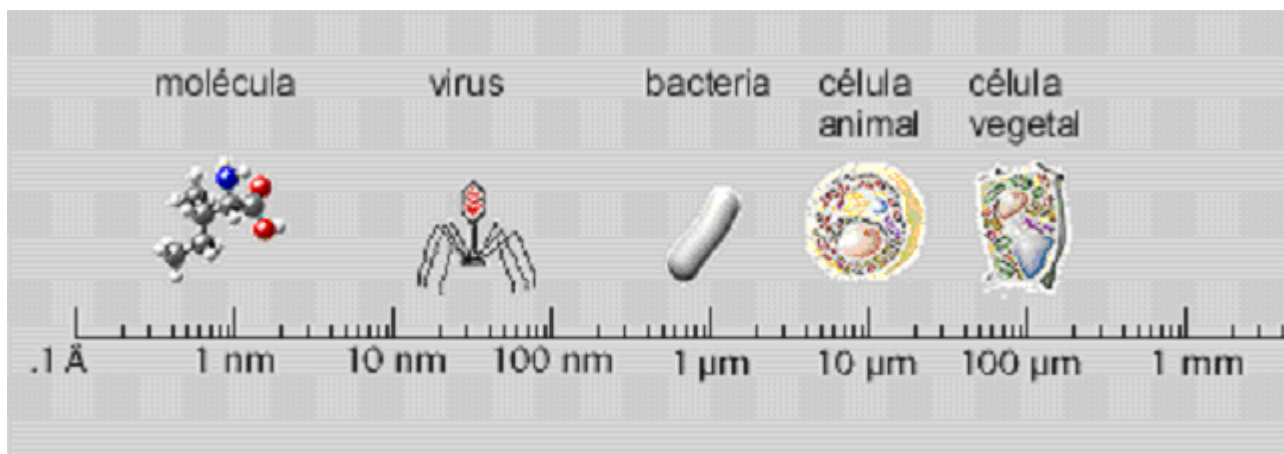
Unidad básica:

- * **metro**

Submúltiplos del metro:

- * **decímetro** (dm): 10^{-1} metros. 0,1 m
- * **centímetro** (cm): 10^{-2} metros. 0,01m
- * **milímetro** (mm): 10^{-3} metros. 0,001 m
- * **micrómetro** (μm): 10^{-6} metros. 0,000001 m
- * **nanómetro** (nm): 10^{-9} metros. 0,000000001 m
- * **angstrom** (\AA): 10^{-10} metros. 0,0000000001 m
- * **picómetro** (pm): 10^{-12} metros.
- * **femtómetro** o **fermi** (fm): 10^{-15} metros.
- * **attómetro** (am): 10^{-18} metros.
- * **zeptómetro** (zm): 10^{-21} metros.
- * **yoctómetro** (ym): 10^{-24} metros.

A nosotros nos interesan los submúltiplos del metro porque los elementos con que trabajan las ciencias biológicas experimentales tienen dimensiones por debajo del metro. Para darnos una idea veamos en forma comparativa el tamaño de las células, las bacterias, los virus y las moléculas.



De todos los submúltiplos del **metro** los más usados son: el milímetro (10^{-3} metros), el micrómetro (10^{-6} metros), el nanómetro (10^{-9} metros) y el Årmstrong (10^{-10} metros).

En todos los casos nos estamos refiriendo a entidades microscópicas o submicroscópicas. Es decir que no son observables a simple vista. Como se muestra en el dibujo, las células de los animales superiores tienen diámetros en el orden de decenas de micrones, en el caso de las plantas hay células cuyo tamaño es de 100 µm o más. Los tamaños de las células del organismo son variables, así por ejemplo, los glóbulos rojos o hematíes miden 7 µm,

los hepatocitos 20 µm, los espermatozoides 53 µm y los óvulos 150 µm. En las células vegetales los granos de polen pueden llegar a medir de 200 a 300 µm y algunos huevos de aves pueden alcanzar entre 1 (codorniz) y 7 centímetros (avestruz) de diámetro. No olvidemos que los huevos son también unicelulares. Entre las células del hombre hay excepciones, las células nerviosas pueden tener filamentos de hasta **¡1 m de longitud!**

Las bacterias que pueden tener formas de esferas o bastones miden entre 1 a 2 µm.

El **nanómetro** es la unidad de longitud que equivale a una milmillonésima parte de un metro, se introdujo en 1951 y reemplazó al milimicrón. Es utilizada comúnmente para medir la **longitud de onda** de la **radiación ultravioleta**, **radiación infrarroja** y la **luz**. En el campo de la biología **los virus tienen tamaños variables entre 24nm como el virus de la fiebre aftosa hasta 300 nm como el virus de la viruela. Los ribosomas que son corpúsculos subcelulares miden 32 nm.**

El **Årmstrong** es una medida muy pequeña (0,000000001 m) que permite expresar las distancias que hay entre las distintas partes de una molécula compleja cuando se muestra su estructura tridimensional. El alcance del microscopio electrónico va de 0,1 Å a 100 nm. Sabemos que 10Å es 1 nm, por eso no es raro encontrar en un libro que los tamaños de algunos virus aparecen en Å por ejemplo un virus cuya cápside (o cuerpo) mida 50 nm puede aparecer como que mide 500 Å.

Una unidad de información genética **kilobase (kb)** es igual a la información provista por 1000 pares de bases en la doble hélice del ADN. El tamaño de los genomas (moléculas de ácido nucleico) se expresa en número de pares de bases. Así el kilobase se usa también como unidad de distancia relativa igual al largo de una cadena de ADN conteniendo 1000 pares de bases.

Tiempo

La unidad de tiempo es el **segundo** que se abrevia **s**. Según la definición del **Sistema Internacional de Unidades**, un **segundo** es igual a 9.192.631.770 períodos de radiación correspondiente a la transición entre los dos niveles hiperfinos del estado fundamental del isótopo 133 del átomo de cesio (^{133}Cs) a cero grados Kelvin. Es la sexagésima parte de un **minuto**.

Las **Unidades de tiempo** más breves que el **segundo** son:

femtosegundo | picosegundo | nanosegundo | microsegundo | milisegundo |

segundo

Las unidades de tiempo mayores que un segundo son:

minuto | hora | día | semana | mes | año | lustro | década | siglo | milenio | cron | eón

En el trabajo experimental se utilizan con mayor frecuencia los segundos, minutos, las horas y a veces los días. Los segundos y minutos suelen medirse con un cronómetro.

Masa

La Unidad de masa es el **kilogramo** (kg)

Un **kilogramo** se define como la **masa** que tiene un **cilindro** compuesto de una **aleación** de **platino-iridio** que se guarda en la **Oficina Internacional de Pesos y Medidas** en Sèvres, cerca de París. Al igual que para las medidas de longitud, nos interesan los submúltiplos del kilogramo cuyos nombres y relaciones con éste son similares a lo que ocurre con el metro.

Las más usadas en el laboratorio son el gramo (gr) 10^{-3} de Kg; el miligramo (mgr) 10^{-6} de Kg o 10^{-3} de gr ambas unidades se usan para expresar el peso de las sustancias que se usan en el laboratorio o los pesos de los animales (ratones) en experimentos realizados con seres vivos.

El **microgramo** es la unidad de masa del **SI** que equivale la milmillonésima parte de un **kilogramo** y también equivale a la millonésima de un **gramo**. El microgramo se emplea en los análisis químicos cuantitativos para medir la pequeñísima cantidad de componentes que tiene una pequeña muestra. El aparato encargado de medir los microgramos es el **espectrofotómetro**. Se abrevia **µg**.

$$1 \mu\text{g} = 0,000\ 000\ 001 \text{ kg} = 10^{-9} \text{ kg} \quad 1 \mu\text{g} = 0,000\ 001 \text{ g} = 10^{-6} \text{ g}$$

Picogramo

Es la unidad de masa del SI, equivalente a la billonésima parte de un **gramo**. Se representa con el símbolo **pg**:

$$1 \text{ pg} = 0,000000000001 \text{ g} = 10^{-12} \text{ g} \quad 1 \text{ pg} = 10^{-9} \text{ mg} = 10^{-15} \text{ Kg}$$

Unidad de masa atómica

Unidad de **masa** utilizada fundamentalmente para expresar la masa de **átomos** y **moléculas**.

Una **Unidad de masa atómica** o **uma**, o **Dalton** nombrada en honor del **químico John Dalton**, es la más pequeña unidad de masa usada para expresar masas atómicas y masas moleculares. Equivale a una doceava parte de la masa del núcleo del **isótopo** más abundante del **carbono**: el ^{12}C . Se corresponde aproximadamente con la masa de un **protón** (o un átomo de **hidrógeno**). Se abrevia como *uma*, aunque también puede encontrarse por su acrónimo inglés: *amu* (*Atomic Mass Unit*).

Las masas atómicas de los elementos químicos dadas en esta unidad suelen ser calculadas con la media ponderada de las masas de los distintos isótopos de cada elemento, lo que explica la aparente no correspondencia entre la masa atómica de un elemento y el número de **nucleones** que alberga su **núcleo**.

$$1 \text{ uma} = 1.67 \times 10^{-27} \text{ kg} \quad \hat{=} 1 \text{ g} \sim 6 \times 10^{23} \text{ uma}$$

Por ejemplo, la **masa atómica** del **Silicio** es de 28,1 uma. Numéricamente es igual a la masa atómica expresada en **g/mol** (*gramos por mol*), es decir, igual a la masa de **NA** átomos o moléculas de una **sustancia** expresada en gramos.

En bioquímica, la unidad de masa atómica se denomina **dalton** (Da o D).

que el nombre alternativo de la unidad de masa atómica. El dalton se usa en microbiología y bioquímica para The dalton is often used in microbiology and bioquímica para referirse a las masas de las moléculas orgánicas grandes. estas mediciones se expresan en **kilodalton (kDa)** (**mil dalton**).

Cantidad de sustancia

Unidad: **mol** (mol)

El **mol** o **molécula gramo** es la unidad básica del **Sistema Internacional de Unidades** que mide la **cantidad de sustancia** (**no es su masa ni su peso**) se representa con el símbolo *mol*.

Los moles miden el número de átomos o moléculas que existen en realidad en un objeto. El nombre alternativo **molécula gramo** se debe a que un mol de un compuesto químico es el mismo número en gramos que el peso molecular del compuesto medido en unidades de masa atómica. La unidad de masa atómica en

gr se calcula dividiendo 1 por el número de Avogadro cuyo valor aceptado es $6.022\ 141\ 99 \times 10^{23}$. La definición oficial adoptada por el sistema **SI** en 1971 es que un **mol** de una sustancia contienen tantos cuerpos elementales (átomos, moléculas, iones, u otras clases de partículas) como átomos hay en 12 grams de carbono-12 (^{12}C es la forma atómica más común del carbón. Son átomos que tienen 6 protones and 6 neutrones). El número real de entidades elementales presentes en un mol es el número de Avogadro (**repasar el capítulo 4**).

En una definición menos formal, al igual que *una docena* de partículas son doce de estas partículas, *un mol* de partículas son $6,022 \times 10^{23}$ (el **número de Avogadro**) de estas partículas. El **mol** se usa como contador de unidades, como la docena (12) o el millar (1000). Se dice que 12 gramos de carbono, o un gramo de hidrógeno, o 56 gramos de hierro, contienen aproximadamente un mol de átomos.

Micromol (μmol)

Es una unidad de cantidad de sustancia igual a la millonésima parte de un **mol** (10^{-6} de mol) Esta unidad se usa corrientemente en bioquímica puesto que un **mol** de una sustancia orgánica es una cantidad muy grande.

Nanomol (nmol)

Es una unidad de cantidad de sustancia igual a 10^{-9} **mol**. de uso común en bioquímica.

Capítulo 6. Quiero investigar

En los capítulos anteriores hemos brindado conocimientos sobre las herramientas que se utilizan en la investigación experimental. Aquí hacemos un alto en la información técnica para reflexionar sobre la naturaleza del proceso de investigación.

El paso a paso de la investigación

Un proceso de investigación se inicia con una **hipótesis de trabajo**. ¿Qué se entiende por hipótesis de trabajo? Según la Real Academia Española (RAE) **hipótesis (del latín y antes del griego)** es una *suposición de algo posible o imposible para sacar de ello una consecuencia*. **Hipótesis de trabajo** es la que *se establece provisionalmente como base de una investigación que puede confirmar o negar la validez de aquella*.

El análisis de la definición nos señala algunas características de las hipótesis:

- suponer. Tiene cinco acepciones, de las cuales vamos a elegir dos. La **1)** Dar algo por sentado y existente, y la **4)** Conjeturar, calcular algo a través de los indicios que se poseen. De modo que, cuando damos vida a una hipótesis, estamos poniendo en juego ambos significados.

Hipótesis de trabajo

- provisionalmente (algo que se hace temporalmente). Esto nos indica que una hipótesis no es definitiva ni fija. Es temporal. Si los resultados que se obtienen no son los esperados, habrá que cambiar la hipótesis. Tal como se suele decir en la jerga (**Lenguaje especial y familiar que usan entre sí los individuos de ciertas profesiones y oficios**) de laboratorio **“los experimentos siempre tienen la razón”**. Deberíamos agregar que la interpretación de los experimentos bien hechos es lo que nos permite avanzar aunque el resultado no fuera el esperado.

- como base de una investigación. Efectivamente, una hipótesis de trabajo es la base desde la que partirá el camino de nuestra investigación. O quizás sea la excusa para investigar, al igual que para un pintor un paisaje puede ser la excusa para pintar.

Cuando se es un aprendiz de investigador, generalmente, no interesa tanto qué investigar sino hacerlo.

Investigar un problema requiere de la aplicación sistemática del razonamiento destinado a resolverlo y es, precisamente, el gozo intelectual que se obtiene al comprobar que nuestras hipótesis de trabajo son ciertas lo que nos mueve a investigar. Vale destacar que muchas veces los resultados no están en línea con la

hipótesis originalmente planteada y esto nos enseña mucho del problema que estamos estudiando ya que nos estimula a plantear nuevas hipótesis. Por supuesto que los resultados de una investigación no sólo producen el gozo en estado puro, a veces tienen una recompensa extra, la de contribuir al bienestar de la humanidad. Pero no hay que olvidarse que también es un trabajo que debe ser remunerado. El concepto de dedicación exclusiva implica una dedicación total a la investigación, en consecuencia, debe considerarse al investigador como un trabajador más. La investigación no admite distracciones, por lo tanto, todo investigador debe recibir un salario apropiado para que sus preocupaciones para subsistir no interfieran con el pensamiento científico.

La experimentación es un arduo camino

La ciencia actual cuenta con un arsenal de técnicas cada vez más precisas y sofisticadas para resolver la mayoría de las hipótesis que se plantean. Pero la elección de una técnica apropiada se complica a veces por la falta de recursos económicos. En los países bautizados “en desarrollo”, eufemismo (*manifestación suave o decorosa de ideas cuya recta y franca expresión sería dura o malsonante*) utilizado por las grandes potencias para no decir países pobres el dinero no sobra. Entonces la elección de las técnicas se basa no sólo en su aplicabilidad al problema planteado sino también en su costo o en la posibilidad de obtención de los reactivos.

Llegar a comprobar una hipótesis puede requerir un solo paso o varios encadenados en forma lógica lo que va a determinar, a su vez, la necesidad de aplicar una o varias técnicas experimentales.

Hay investigaciones que consisten en desarrollar (*crear*) técnicas destinadas a un determinado fin. Pero la mayoría de las veces se aplican técnicas puestas a punto por otros investigadores. Por eso, el **segundo paso** de nuestra investigación será realizar una exhaustiva (*que agota o apura por completo*) búsqueda bibliográfica del tema que nos ocupa, con dos objetivos:

buscar técnicas apropiadas y observar cómo podríamos abordar la resolución del problema ya que seguramente se habrán publicado investigaciones parecidas.

Repasemos:

- **primer paso de la investigación: génesis de una hipótesis de trabajo.**
- **segundo paso de la investigación: búsqueda bibliográfica.**

Así como tenemos la suerte de contar con aparatos y técnicas de mucha precisión también vamos a enfrentar un problema que, con toda seguridad, ya habrá sido abordado por otros . Y no sea el caso que encontremos lo que ya estaba encontrado. Afortunadamente la existencia de Internet y las bases de datos de los artículos publicados permiten realizar búsquedas rápidas y completas. Pero...cuidado,



aunque, al igual que al monstruo, nos acompañe la lamparita del genio y la avidez por nuestro propio bocado, hay que prestar mucha atención (**para eso también tiene ojitos!**). La información que se brinda por Internet no es completa, comienza a partir de 1964-1965 y hay publicaciones que aparecieron mucho antes. Así por ejemplo *Nature, una de las revistas de investigación en ciencias naturales más prestigiosas del mundo*, apareció en 1869.

En la actualidad es bastante común encontrar trabajos de investigación que *descubren lo que ya estaba descubierto*, la diferencia es que se usaron técnicas de análisis más modernas. Los resultados pueden que sean más aproximados a la realidad, pero el fenómeno ya se conocía. Cuando se familiaricen con la lectura de trabajos de investigación, llamados coloquialmente *papers*, van a encontrar en la mayoría de ellos una frase que dice: “esta es la primera vez que se describe ...”. El atractivo por la primera vez parece ser muy apreciado por el hombre en muchos los aspectos de su vida. Pero... hablar de primera vez es muy peligroso en Ciencia, porque puede evidenciar la ignorancia del investigador que no lee ni se actualiza.

Serendipia

Así como varios grupos de investigadores en los años 50 del siglo pasado buscaban afanosamente averiguar cómo era la estructura del ADN mediante la formulación de modelos, otros grandes descubrimientos han ocurrido por casualidad sin que haya mediado una hipótesis de trabajo previa. La serendipia (¡qué palabrita!) Para referir a hallazgos obtenidos “por casualidad”, los científicos emplean el término *serendipity* (**De paso les recuerdo que si quieren ser científicos tienen que acostumbrarse a dominar el idioma inglés**).

Serendipia, en español, es un neologismo derivado de *serendipity* que significa: “condición del descubrimiento que se realiza gracias a una combinación de accidente y sagacidad”. El término no aparece en el diccionario de la RAE aunque aparece en el **Diccionario del Español Actual** de Manuel Seco, que recoge el término como *serendipidad*, y la define como *facultad de hacer un descubrimiento o hallazgo afortunado de manera accidental*.

El experimento más importante y conocido que ocurrió por *serendipity* fue el descubrimiento de la penicilina, pero no es el único ejemplo, hasta el mismo Einstein reconoce esta cualidad en algunos de sus hallazgos.

Quizás les interese conocer de dónde surgió la palabra **serendip**: es la transcripción inglesa del nombre persa de la isla del Índico conocida hoy como Ceilán, cuyo nombre oficial es Sri Lanka. Los persas lo tomaron del árabe Sarandib o Serendib, nombres que nos han llegado directamente en obras literarias, como la historia de Simbad. . El término en sí fue creado por Horace Walpole en 1754 como consecuencia de la impresión que le produjo la lectura de un cuento de hadas sobre las aventuras de "Los Tres Príncipes de Serendip", que forma parte del famoso libro de "Las mil y una noches", que hacían continuamente descubrimientos, por accidente y sagacidad, de cosas que no se habían planteado.

Existen otros descubrimientos e inventos que surgieron por serendipia, como por ejemplo:

- ? las microondas de radiación cósmica de fondo
- ? la gelatina explosiva
- ? el polietileno
- ? las notitas de papel amarillo o verde con pegamento (conocidas como *post it*)
- ? los efectos psicodélicos del ácido lisérgico (LSD)

Para nombrar sólo algunos.

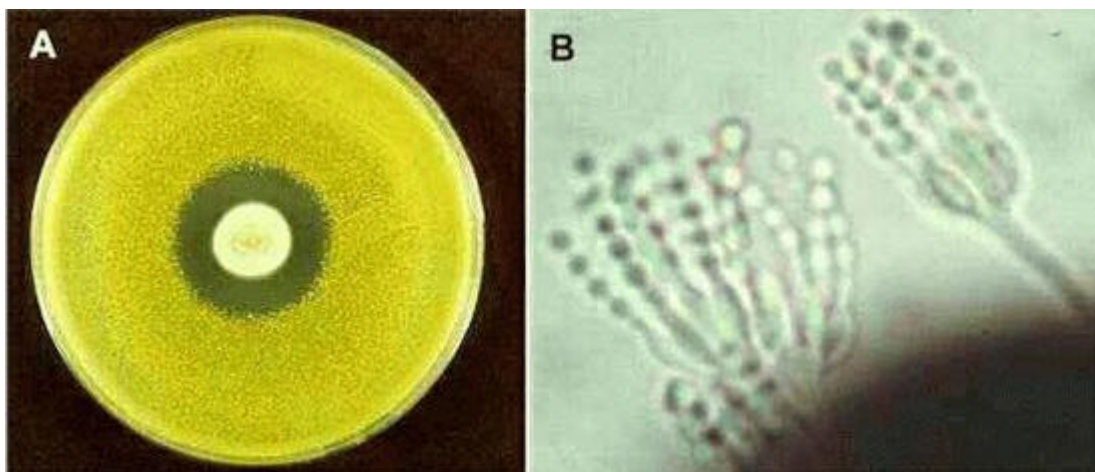
El descubrimiento de la penicilina

Por la importancia que este antibiótico ha tenido y tiene para la salud, vamos a recordar quién y cómo se efectuó su descubrimiento.

Sir Alexander Fleming (1881-1955) es el descubridor de la proteína antimicrobiana llamada *lisozima* y del *antibiótico penicilina* obtenido a partir del hongo *Penicillium notatum*. Fleming nació en Escocia y murió en Londres, Inglaterra. Trabajó como médico microbiólogo en el Hospital St. Mary de Londres hasta el comienzo de la Primera Guerra Mundial. Durante la guerra fue médico militar en los frentes de Francia y quedó impresionado por la gran mortandad causada por las heridas de metralla infectadas (ej.: gangrena gaseosa) en los hospitales de campaña. Finalizada la guerra, regresó al Hospital St. Mary donde buscó intensamente un nuevo antiséptico que evitase la dura agonía provocada por las infecciones durante la guerra. Una serie de circunstancias confluyeron (**coincidieron**) para que se produjera tan importante observación. El laboratorio de Fleming estaba habitualmente desordenado, ocupado por numerosos cultivos de bacterias en placas de Petri (**cajas de vidrio tapadas que permiten el ingreso del aire usadas para cultivar bacterias sobre una capa de agar con nutrientes ? ver foto?**) que cubrían las mesadas del laboratorio. Después de una semana de vacaciones, Fleming decidió ordenar, pero antes de descartar los cultivos los observó detenidamente. Para ese entonces, septiembre de 1928, se encontraba trabajando con la bacteria *Staphylococcus aureus*. En una de las placas que iba a tirar había crecido una colonia de un hongo que resultó ser *Penicillium notatum*. Hongo común, de color verde, que a veces encontramos sobre un pan húmedo. Pero lo que le llamó la atención a Fleming es que las colonias de bacterias alrededor del hongo

eran transparentes porque habían sido lisadas (**destruidas porque la penicilina no les permite sintetizar las paredes a las bacterias, por lo que literalmente explotan**).

Esto lo podemos ver en la foto que mostramos a continuación:



La foto A muestra una placa de Petri sembrada con bacterias que no han crecido alrededor del centro donde hay una colonia del hongo *Penicillium*. Foto B: muestra los micelios (talos ramificados) del hongo visto al microscopio.

La lisis significaba la muerte de las bacterias, y en su caso, la de las bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*) crecidas en la placa. Pensó que algo soluble que provenía del hongo era lo que mataba a las bacterias. Inmediatamente, reconoció la trascendencia de este hallazgo, pero sus colegas lo subestimaron. Fleming comunicó su descubrimiento sobre la penicilina en el *British Journal of Experimental Pathology* en 1929. Su trabajo no tuvo para ese entonces ninguna trascendencia. Sin embargo, Fleming trabajó con el hongo durante un tiempo pero la obtención y purificación de la penicilina a partir de los cultivos de *Penicillium notatum* resultaron difíciles y más apropiados para los químicos. La comunidad científica creyó que la penicilina sólo sería útil para tratar infecciones banales y por eso no le prestó atención. A pesar de ello, el antibiótico despertó el interés de los investigadores norteamericanos durante la Segunda Guerra Mundial, quienes intentaban emular a la medicina militar alemana la cual disponía de las sulfamidas. Los químicos norteamericanos Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey desarrollaron un método de purificación de la penicilina que permitió su síntesis y distribución comercial para el resto de la población.

Fleming no patentó su descubrimiento creyendo que así sería más fácil la difusión de un antibiótico necesario para el tratamiento de las numerosas infecciones que azotaban a la población. Por sus descubrimientos, Fleming compartió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1945 junto a Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey. El descubrimiento de Fleming dio lugar a la *Era de los antibióticos* en la medicina moderna. Si

bien la **serendipia** tuvo mucho que ver en este descubrimiento, no restemos importancia al investigador. Si no hubiera sido un observador entrenado y no hubiera tenido la mente abierta a lo inusual, no habría habido descubrimiento. De hecho, millones de vidas se han salvado gracias a su observación.

Hay quienes piensan que descubrir algo importante de esta forma es imitar al burro flautista, como se cuenta en la fábula del español Tomás de Iriarte:

EL BURRO FLAUTISTA

Esta fabulilla,
salga bien o mal,
me ha ocurrido ahora
por casualidad.

Cerca de unos prados
que hay en mi lugar,
pasaba un borrico
por casualidad.

Una flauta en ellos
halló, que un zagal
se dejó olvidada
por casualidad.

Acercóse a olerla
el dicho animal,
y dio un resoplido
por casualidad.

En la flauta el aire
se hubo de colar,
y sonó la flauta
por casualidad.

«¡Oh!», dijo el borrico,

«¡qué bien sé tocar!

¡y dirán que es mala

la música asnal!»

Sin regla del arte,

borriquitos hay

que una vez aciertan

por casualidad.

Pero no es así, si bien interviene la casualidad, la serendipia requiere de un observador entrenado y quizás esta sea una buena receta para el aspirante a investigador, la observación es una cualidad indispensable del individuo que quiere resolver un problema.

Bibliografía:

Ha sido fundamental la ayuda de la Wikipedia.

http://es.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming"

Capítulo 7. Números y ratones

Introducción

En la mayoría de los casos, los resultados de un experimento se pueden cuantificar, es decir, expresar en números, lo que nos permite comparar con otros resultados de experimentos parecidos y sacar conclusiones válidas estadísticamente. Hoy en día es muy fácil realizar estos cálculos matemáticos porque hay numerosos programas de estadística accesibles para computadora que los programas de computación. Lo mismo ocurre cuando se necesita representar en forma de gráficos los resultados de un experimento.

Pero lo principal es saber qué le vamos a pedir a la computadora, que entendamos el significado de los valores que estamos buscando y qué cálculos debemos aplicar a nuestro experimento en particular.

Para ilustrar este concepto vamos a trabajar con ratones no tan simpáticos como los que vemos aquí, pero ratones al fin.



La experimentación con animales podría suponerse como una práctica cruel, sin embargo el uso de animales de laboratorio en investigación científica está estrictamente regulado por los comités de ética de las instituciones donde se desarrolla el trabajo, avalados por otros comités internacionales y en el marco de la convención de Helsinki (declaración internacional de 1974 que reglamenta la experimentación con animales entre otras normas) y otros tratados internacionales. El trabajo con animales de laboratorio (principalmente ratones, ratas, conejos, cobayos y hamsters) es irremplazable en algunas situaciones sobre todo porque para muchas pruebas, como por ejemplo, las de toxicidad de un determinado medicamento que se va a emplear en seres humanos es necesario conocer de antemano sus efectos tóxicos o indeseables. Existe la voluntad de utilizar otros reactivos en lugar de seres vivos y, en muchos casos se hace, pero la reglamentación del estudio de medicamentos en seres humanos establece que debe haber un estudio previo en animales y a esta instancia se la llama investigación preclínica. Los parámetros que vamos a presentar en este capítulo se obtienen principalmente trabajando con ratones aunque también se pueden usar ratas u otros animales superiores.

Uso del Porcentaje.

En ciertos experimentos puede resultar útil el uso de una relación porcentual o un porcentaje (%). Cuando se calcula el % sobre un conjunto de valores es como si se relativizaran dichos valores respecto del 100%. Todo de “algo” es el 100% y una parte del todo será 10%, 20%, 50%, 90% etc. El cálculo del % es muy simple y consiste en aplicar una regla de tres. Así por ejemplo, si dispongo de 80 ratones y quiero saber qué % representan 20 ratones, realizo la siguiente cuenta:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de ratones} \times 100 \%}{\text{n}^{\circ} \text{ fracción de ratones}} = \frac{80 \times 100 \%}{20} = 25 \%$$

Pasemos a los ejemplos:

Caso 1) Si inyectamos a 80 ratones 20g de un veneno de serpiente **A** y mueren todos los ratones, ese veneno produce una letalidad del 100%.

Caso 2) Si inyectamos a 80 ratones 20?g de un veneno de serpiente **B** y mueren 20 ratones (de acuerdo al cálculo) la letalidad es del 25%.

La conclusión del experimento es que el veneno A es más poderoso que el veneno B, ya que a igualdad de cantidad de veneno inyectado la letalidad es mayor.

Sin embargo, si nos ponemos a pensar en el significado de la muerte del 100% de los ratones, nos daríamos cuenta de que al correlacionar con la cantidad de veneno que produce ese efecto (**dosis**) nos podemos equivocar. Así por ejemplo, si en lugar de 80 ratones usáramos 120, puede que esa misma dosis los mate y entonces el cálculo relativo tomando como base 120 nos daría valores distintos. Esto se vería claramente si construyéramos una curva patrón (**ver capítulo 3**) con distintas concentraciones de veneno y calculáramos el % de mortalidad. Encontraríamos, entonces, que por encima de cierto valor de concentración de veneno siempre muere el 100% de los animales. Es por eso que se utiliza como parámetro comparativo entre drogas no la mortalidad 100% sino la mortalidad 50% (que involucra a la mitad de la población).

Mortalidad

La dosis letal cincuenta o DL₅₀

Es la cantidad de una sustancia expresada en gr o ? gr capaz de matar al 50 % de los animales inoculados. La DL50 es una medida de uso común en Toxicología y en Farmacología, también se aplica para el cálculo de título de un virus que en ese caso sería la cantidad de virus necesaria para matar al 50% de la población. En algunos casos suele usarse la DL25 o la DL75.

No siempre al valor del 50% le corresponde una cantidad entera por ejemplo, si usamos la serie 0, 10, 20, 30 40, 50, 60 y 70 ?gr/ml para inyectar grupos de 10 animales, cada uno como se ve en el Cuadro 7.1.

Cuadro 7.1 Resultados obtenidos inoculando distintas concentraciones de un tóxico utilizando 10 animales para cada concentración

Cantidad de sustancia mg	Número de animales muertos	% mortalidad
0	0/10	0
10	1/10	10
20	4/10	40
30	6/10	60
40	8/10	80
50	9/10	90
60	10/10	100
70	10/10	100

Como podemos observar el 50% de letalidad está entre 20 y 30 μ g los valores que corresponden a una letalidad inmediatamente por debajo del 50% e inmediatamente por encima del 50%. Existen métodos matemáticos muy viejos como el de Reed y Muench (1936) que permiten determinar con precisión la DL50 realizando cálculos relativamente simples. Otra forma es interpolar en una recta construida con los valores obtenidos, usando los valores de concentración en la abscisa y los de mortalidad en la ordenada. Para el caso presentado en el Cuadro 6.1, el cálculo es muy simple y se encuentra que la **DL50 es de 25 μ g**.

Morbilidad

Proporción de personas que enferman en un sitio y tiempo determinado es la definición de morbilidad. También podemos estudiar la morbilidad que produce un virus en ratones o la administración de una droga. Es decir, en lugar de observar una respuesta tan drástica como la muerte, se observa si los animales enferman. Como los animales no pueden expresarse, hay formas de establecer si el animal enferma, que suelen ser indicativas y certeras. Por ejemplo: se pueden pesar diariamente y construir una curva de peso en gramos que se comparará con el peso de un grupo de animales al que se les administró placebo (aunque en los animales no hay efecto subjetivo de la administración del diluyente sin droga, suele llamarse así igual que si se tratara de personas). Recordemos lo aprendido en el capítulo 1 "El blanco o el control". Otra forma de reconocer enfermedad es por la aparición de signos neurológicos: erizamiento del pelo, responder al "spin test" con marcha lateralizada y aparición de parálisis de las patas posteriores. (El spin test consiste en tomar a los ratones por la cola y hacerlos girar varias vueltas, esta acción desencadena una marcha lateralizada de la que se recuperan rápidamente si están sanos). Otras veces los signos neurológicos aparecen simplemente ante un sonido fuerte.

La morbilidad se puede cuantificar en %, pero permite, además, la medición de otros parámetros (dato o factor que se toma como necesario para valorizar una situación), por ejemplo: día de iniciación de la enfermedad, tiempo que dura la enfermedad, severidad de los síntomas (si es que hay varios). Cuando no se trata de toxicidad aguda, los animales mueren en uno o dos días; la enfermedad precede a la muerte y esta puede ocurrir en un período prolongado que puede alcanzar los 30 días. Los experimentos de producción de tumores por agentes cancerígenos o virus suelen prolongarse durante meses. Cuando se estudian medicamentos para curar enfermedades, no sólo conviene determinar que se alteró la DL50, a veces es suficiente con observar que los parámetros con los que se caracteriza la enfermedad han disminuido. Los animales no pierden peso, la aparición de los síntomas es más tardía, la severidad de los síntomas es menor, etc.

No pretendemos en este capítulo agotar el tema del uso de los animales, existen otras numerosas determinaciones que pueden realizarse con ellos. Sí, queremos ofrecer a nuestros lectores algunas reflexiones sobre el manejo de los animales de experimentación (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.2. Consejos sobre el uso de animales en experimentación

- Siempre que sea posible, sustituir el uso de animales por otro tipo de reactivos biológicos.
- Cuando no sea posible prescindir de los animales, realizar los cálculos necesarios para usar el número más pequeño posible. Lo único que hay que tener en cuenta es que los resultados que se obtengan sean significativos (que no ofrezcan dudas).
- No usar animales para responder preguntas sin importancia.
- Mantener los animales en condiciones confortables de higiene y bien alimentados.
- Tratarlos sin crueldad, pero considerarlos que son parte de un experimento. No encariñarse con ellos ni ponerles nombres. Cuando llegue el momento de matarlos, si el experimento lo requiere, al animal que tiene un nombre no se lo podrá matar y puede que se arruine todo el experimento y que el resto de los animales se hayan sacrificado porque sí.
- Los monos son muy sensibles a las manipulaciones, suelen encariñarse con los cuidadores y odiar a los investigadores que los mortifican.
- Trabajar con cualquier animal sin producirle dolor, utilizar anestésicos cuando se los someta a prácticas dolorosas.
- Cuando se trata de ratones hembras con sus crías, no hay que manosear mucho las crías porque, cuando la madre reconoce en ellas el olor de una persona, se las comerá.
- Utilizar técnicas y elementos de protección para resguardar la salud del operador.
- Descartar los animales muertos siguiendo las normas correctas de bioseguridad.
- Hay que familiarizarse con las reglas recomendadas para el uso y manejo de animales. En muchas instituciones se necesita autorización del comité de ética para trabajar con seres vivos.

Capítulo 8. El sistema inmune

Algunos consejos

A medida que se vayan internando en los conocimientos que brinda este curso, más distancia, medida en lectura y aprendizaje, se establece entre lo que quieran conocer puntualmente y lo que obligatoriamente deben saber antes. Nuestro propósito es introducirlos al mundo actual de los reactivos biológicos, pero..., nos dimos cuenta que tenemos que estar seguros de que conocen cómo está conformado el sistema inmune y cómo funciona. Por eso este capítulo pretende introducirlos en el tema en la forma más simple posible. ¿Y saben qué?, los lectores que poseen ese conocimiento pueden saltar su lectura y concentrarse en el capítulo siguiente.

Nociones básicas

Los seres vivos, desde el hombre hasta los microorganismos, libran entre sí continuas batallas para sobrevivir. El hombre cría animales para alimentarse, depreda (**robar, saquear con violencia**) a los peces con el mismo fin o por deporte y aplica la misma política destructiva cuando arrasa el hábitat de los animales salvajes. En la otra punta del espectro de la vida están los microorganismos: virus, bacterias, parásitos, hongos patógenos, y, otros, que constituyen un ejército invisible y, a veces, invencible que asola (**destruye, arruina, arrasa**) a la humanidad. Nuestra vida transcurre amenazada por miles de bacterias y virus que pretenden ingresar al organismo donde conseguirán nutrientes y energía para multiplicarse, afortunadamente, se cuenta con barreras poderosas de protección.

La piel además de ser gruesa y dura como para ser penetrada fácilmente, produce una serie de sustancias dañinas para los m.o invasores. Los ojos, la nariz y la boca están protegidas por líquidos o mucus que los atrapa. El tracto respiratorio tiene su forma de defensa en la tos, que nos hace expulsar cuerpos extraños que pueden estar infectados, y en el moco, al que se pegan los m.o. Unos pelos pequeñitos ubicados en superficie de las células, llamados cilias, tienen movimiento propio y que desplazan el moco hacia arriba hasta que lo tragamos. Y, si ninguna de estas barreras detiene al invasor al llegar al estómago muere en un mar de ácido. Pero muchas veces, estas barreras naturales no son suficientes y el ingreso al cuerpo de organismos extraños tiene lugar igual. Porque a pesar de todas las defensas los m.o se las arreglan para sortearlas e ingresan con la comida, mientras que otros, se cuelan por la nariz o través de las heridas que se producen en la piel. Pero si los m.o nos acosan permanentemente, ¿cómo es que la mayor parte del tiempo estamos sanos?. Por suerte tenemos muchas maneras de defendernos una vez que los m.o se las arreglaron para escapar de esas defensas naturales.

Si nos cortamos, las bacterias penetran al organismo a través de la herida y aunque las células locales mueren desencadenan antes una respuesta automática llamada **inflamación**. Los vasos sanguíneos se dilatan y la sangre fluye en cantidad hacia el lugar. La inflamación, que funciona como una alarma contra los ladrones, una vez que se dispara permite que muchas células defensoras lleguen al lugar lo que se observa por la aparición en la zona de un enrojecimiento e hinchazón.

¿Porqué hay esta reacción? Esto ocurre, porque el hombre cuenta con el sistema inmune (SI) que lo protege de todos los m.o ó elementos extraños que quieren invadir su organismo.

El SI es muy complejo y está constituido por varios tipos de células y proteínas que cumplen tareas diferentes para evitar la infección (**infectar: Dicho de algunos microorganismos patógenos, como los virus o las bacterias al Invadir un ser vivo y multiplicarse en él**).

Los protagonistas del sistema inmune

Inmunidad natural o innata.

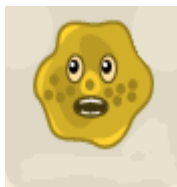
Hay dos clases de protagonistas que constituyen el SI unos son celulares y se conocen como fagocitos (células que comen) y las proteínas del sistema complemento. Hoy se sabe que los fagocitos son de tres clases: Una clase especial de leucocitos o glóbulos blancos llamados granulocitos, macrófagos y células dendríticas.

Ilya Mechnikov fue el descubridor de los fagocitos, el que les puso ese nombre, y el que estableció la teoría del papel de estas células en la respuesta del organismo a la infección. Por esa teoría recibió en 1908 el premio Nobel de Medicina y Fisiología. Pero lo más alucinante de su trabajo es haber descubierto a los fagocitos trabajando con larvas transparentes de estrellas de mar a las que les introducía una espina y miraba con el microscopio. A las 24 horas observaba una llegada en masa de corpúsculos al sitio de la herida que querían devorar a la espina. Convertir su observación en una explicación de cómo funciona el sistema inmune es realmente genial. Introdujo así el papel celular en la defensa o resistencia del organismo a la enfermedad.

Hoy sabemos que en la defensa, además de la fagocitosis, operan otros mecanismos más complejos, pero la lectura de su discurso no deja de asombrarnos. Para ilustrar este capítulo hemos recurrido al sitio <http://nobelprize.org/medicine/educational/immunity/>, el texto de las figuras ha sido traducido al español.

Tipos de fagocitos

Los granulocitos:



son glóbulos blancos que a menudo constituyen la primera fila de defensa ante una infección. Atacan a los invasores en gran número y comen hasta morir. El pus de una herida infectada consiste fundamentalmente

de granulocitos muertos. Una pequeña parte de la comunidad de los granulocitos están especializados en atacar a los parásitos como los gusanos.

Los macrófagos



son los grandes comedores, son menos rápidos para responder a los invasores que los granulocitos pero son más grandes, viven más tiempo y tienen otras propiedades como veremos más adelante. Los macrófagos juegan un papel importante en alertar al resto del sistema inmune. Los macrófagos son en principio los monocitos que circulan en la sangre pero cuando dejan la circulación y atraviesan los tejidos se convierten en macrófagos.

Las células dendríticas o dendrocitos



al igual que los granulocitos y macrófagos, las células dendríticas son devoradores de intrusos, como los macrófagos ayudan al resto del sistema inmune. También pueden filtrar los fluidos corporales limpiándolos de organismos extraños y partículas.

El sistema Complemento

La primera parte del SI que se encuentra con invasores tales como bacterias es un grupo de proteínas denominadas el *sistema complemento*. Estas proteínas flotan en forma libre en la sangre y pueden acudir rápidamente al sitio de invasión en donde reaccionan con los **antígenos** (moléculas reconocidas por el cuerpo como sustancias extrañas). Cuando se activan las proteínas del complemento pueden cumplir varios papeles:

- gatillar la inflamación
- atraer al área fagocitos como los GRANULOCITOS
- recubrir a los intrusos de modo tal que los fagocitos los devoran más fácilmente
- matar a los intrusos

Además de las proteínas del complemento intervienen otras proteínas liberadas de otros glóbulos blancos (**linfocitos**) denominadas **linfocinas** o **infoquinas**, o por las células del tejido, llamadas citoquinas, que también intervienen activamente en la respuesta inmune cumpliendo diferentes funciones.

En forma simplificada hemos descrito la respuesta de un organismo cuando se enfrenta por primera vez con un antígeno extraño. Esta respuesta inflamatoria se conoce con el nombre de inmunidad natural o inmunidad innata, no específica. Es la primera que opera y que dará lugar a una respuesta específica en la que intervienen los linfocitos y los anticuerpos que es la respuesta inmune.

Células participantes de la respuesta inmune: linfocitos T y B.

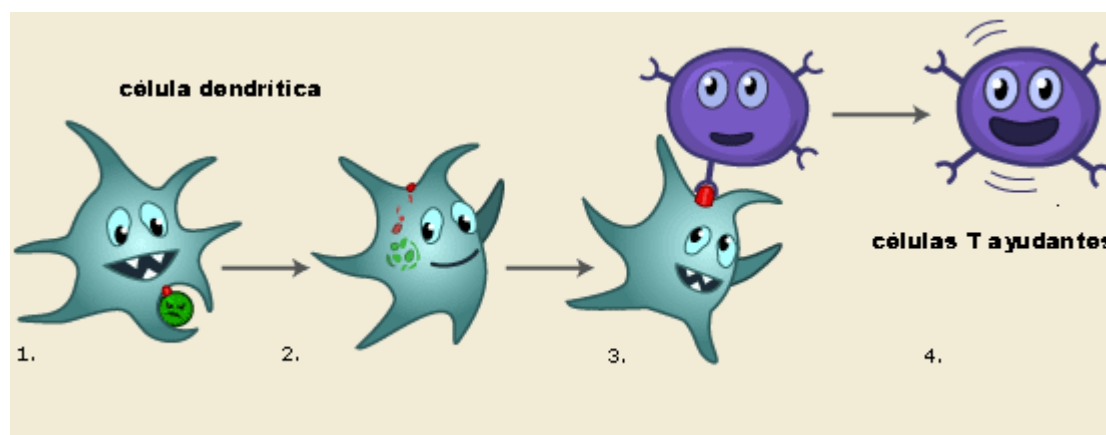
Las células de la serie blanca de la sangre conocidas como linfocitos se originan en la médula ósea y migran a los distintos componentes del sistema linfático (SL) (nódulos linfáticos, bazo y timo) por los vasos linfáticos. Hay dos tipos principales de linfocitos. las células T y las células B. El SL sirve para el transporte y almacenamiento de los linfocitos. Permite la filtración de las células muertas y de las bacterias extrañas. Sobre la superficie de cada célula linfática hay receptores que les permiten reconocer sustancias extrañas. Esos receptores son tan especializados que cada receptor reconoce a una sola clase de antígeno. El ejemplo siguiente, tomado de la bibliografía, describe esa situación en forma muy gráfica, imaginemos que tenemos manos que sólo pueden agarrar manzanas nos convertiremos en especialistas agarra-manzanas, pero la forma de nuestras manos no nos permitirá levantar peras ni otras formas diferentes. Lo mismo pasa con los receptores, cada linfocito posee un receptor de una forma determinada que le permitirá unirse o ajustarse a un antígeno. El repertorio de linfocitos con diferentes receptores es tan grande que le permite al organismo el reconocimiento de cualquier m.o invasor.

Linfocitos T

Los linfocitos T se presentan en dos formas: los **linfocitos ayudantes** y los **asesinos**. Su nombre proviene de su lugar de maduración, el timo. Estos linfocitos son producidos por la médula ósea y luego migran al timo en donde maduran.

Los linfocitos ayudantes son los principales reguladores de la respuesta inmune. Su función primaria es activar a los linfocitos T asesinos y a los Infocitos B. Pero los linfocitos ayudantes, a su vez, necesitan ser activados y este proceso de activación ocurre por la participación de los macrófagos o las células dendríticas como se muestra en la figura siguiente.

Presentación de un antígeno a un linfocito T ayudante



1. Un fagocito (dendrocito) se come a una bacteria
2. Las partes de la bacterias (antígenos) migran hacia la superficie del fagocito
3. El fagocito presenta (le muestra) el antígeno al linfocito T ayudante.
4. El linfocito T se convierte en una célula activada.

Los macrófagos o los dendrocitos viajan hacia el ganglio más cercano y presentan la información sobre el patógeno para ello muestran en su superficie los antígenos. Han digerido al m.o y lo han reducido sus antígenos a fragmentos en un proceso fundamental conocido como **presentación del antígeno**. Luego un linfocito T ayudante que tenga en su superficie un receptor capaz de reconocer a ese antígeno se activará y como consecuencia comenzará a dividirse y a producir proteínas que a su vez activarán a los linfocitos B, a otros linfocitos T y a otras células inmunes.

Linfocitos T asesinos (killers)

Estos linfocitos se especializan en atacar a las células del organismo infectadas por virus, bacterias y también a las células cancerosas. Los linfocitos T asesinos tienen receptores que sirven para investigar cada célula que encuentran en la búsqueda de trazas de antígeno que delate la presencia del virus dentro de la célula. Esto ocurre porque cuando un virus multiplica en una célula sus antígenos migran hacia la membrana plasmática (externa) para enterrarse en ella y formar un polo de atracción a donde irán los diferentes componentes del virus antes de salir de la célula como nuevas partículas.

Linfocitos B.

Los linfocitos B patrullan el organismo en búsqueda del antígeno que concuerda con sus receptores, una vez que lo encuentran se conectan con él dentro de su célula se dispara una señal y con la ayuda de las proteínas producidas por los linfocitos T ayudantes, se activan. Cuando esto ocurre comienzan a dividirse y a

formar clones de sí mismas, durante este proceso se forman dos tipos de células las llamadas células de la memoria y las células plasmáticas. Las células de la memoria, tal como dice su nombre, recordarán a ese antígeno para siempre. De modo que una segunda vez que el antígeno entre al organismo se disparará lo que se conoce como respuesta inmune, reconocimiento específico del antígeno extraño por medio de los anticuerpos específicos que son sintetizados por las células plasmáticas.

Célula plasmática (no desesperen hemos llegado a nuestro objetivo)

La célula plasmática es una célula especializada que produce proteínas muy especiales y especializadas: **¡los anticuerpos!** Los anticuerpos son los que se formarán cada vez que aparezca el mismo antígeno que los incitó (**incitar: mover o estimular a alguien para que ejecute algo**). Los anticuerpos liberados por las células plasmáticas viajarán por la sangre y cumplirán la función de capturar a su antígeno complementario ya sea que se encuentre libre o inserto en una membrana celular. La velocidad con que las células plasmáticas sintetizan los anticuerpos es fantástica ya que liberan miles de moléculas de anticuerpo por segundo. Los anticuerpos tienen forma de **Y** como se muestra en el dibujo de la figura 5 estos anticuerpos unidos al antígeno son un bocado para los fagocitos que los devoran y también al unirse a los antígenos presentes en las células infectadas es como si le pusieran una marca para que otras células las coman. Cada rama de la **Y** puede tomar un tipo de antígeno, por eso los anticuerpos pueden congregarse a un grupo de bacterias que son fácilmente devoradas por los macrófagos o atacadas por las proteínas del complemento.

Vemos en la figura tres tipos de anticuerpos pintados en celeste que presentan forma de **Y** y en cada punta de la **Y** una forma diferente, para facilitar la lectura hemos puesto números. El anticuerpo número 1 se une al antígeno 1 (ver las formas) de los llamados epitopos (concepto sobre el que volveremos en el próximo capítulo). Por ahora definiremos a los **epitopos o epitopes** como aquellas partes de la molécula del antígeno reconocida por los anticuerpos. Hemos dejado aparte, sin numerar, a un antígeno que muestra los tres epitopos, podemos imaginar que podrá ser atacado por tres anticuerpos.

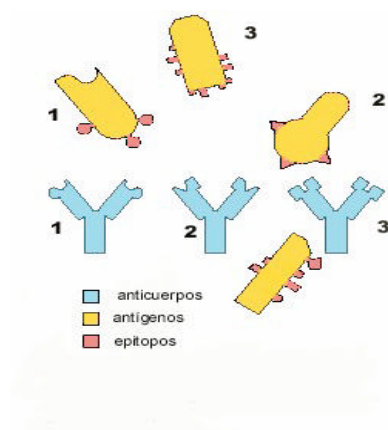


Figura 5. Esquema de tres anticuerpos capaces de distinguir a tres tipos de antígenos, Vemos que la forma de los epitopos de 1 se ajustan como pieza de un rompecabeza en los extremos de la Y del anticuerpo correspondiente. Lo mismo pasa con 2 y 3.

Producción de los anticuerpos

La figura 6 es una diagrama que permite entender cómo se desencadena la producción de anticuerpos. Se pueden distinguir cinco pasos que terminan en la síntesis de anticuerpos específicos.

Células de memoria

Como dijimos más arriba son el segundo tipo de células que se producen por división de las células B. Son células de vida prolongada capaces de recordar a los intrusos. Las células T son también capaces de producir células de memoria que tienen una vida todavía más prolongada que las B. Como ya comentamos la segunda vez que un m.o invade al individuo tanto las células B como las T se activan e inmediatamente se desencadena la respuesta inmune por lo que los síntomas de enfermedad no aparecen.

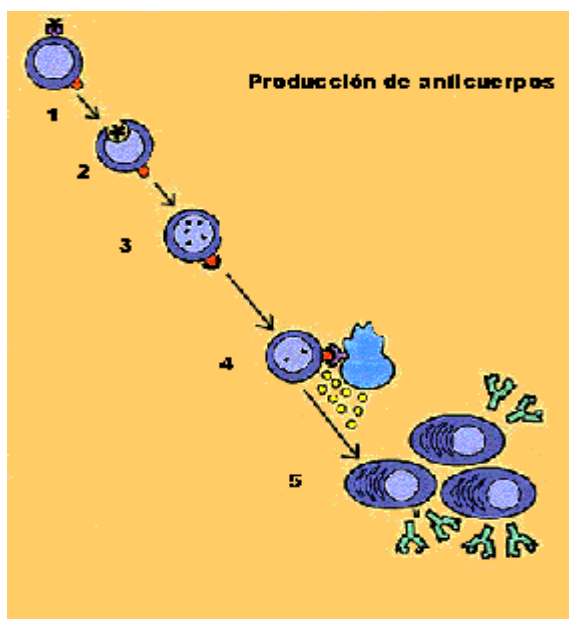


Figura 6. Producción de anticuerpos.

paso 1. Los anticuerpos se desencadenan cuando una célula B encuentra al antígeno con el que se complementa.

paso 2. la célula B toma al antígeno y lo digiere.

paso 3. muestra los fragmentos del antígeno unido a sus propios marcadores celulares.

paso 4. la combinación de ambos atrae a las células T maduras que también complementan en la forma.

paso 5 las linfocinas secretadas por las células T permiten la maduración de las B que comienzan a dividirse en células plasmáticas (productoras de anticuerpos) y células de memoria. Los anticuerpos circulan por la sangre capturan al antígeno y lo eliminan por el bazo o el hígado.

Eliminando a los intrusos: la respuesta inmune.

La figura 7 muestra esquemáticamente el proceso que se desencadena en el organismo llamado la respuesta inmune y que nos permite sobrevivir asediados por miles de gérmenes.

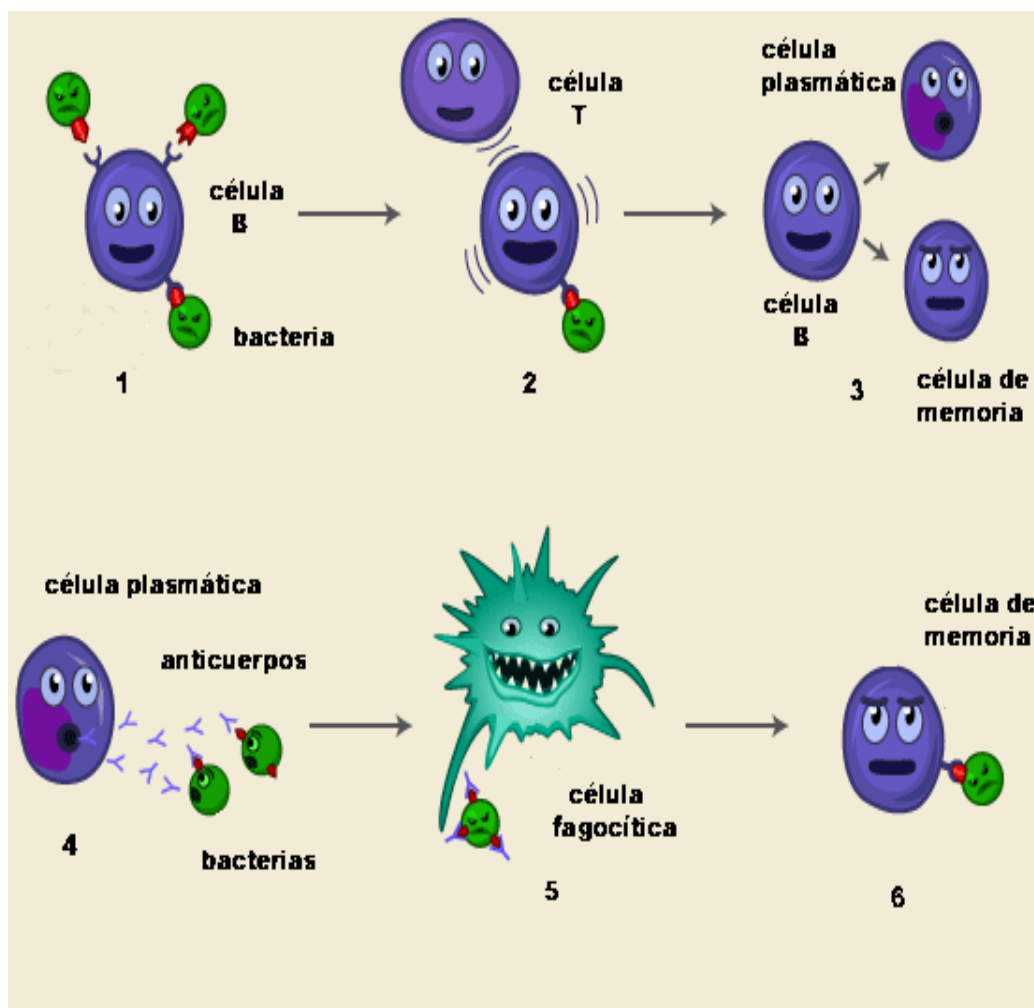


Figura 7.

paso 1 La célula B encuentra a un antígeno con el que se complementa, una forma encaja en la otra presente en una bacteria invasora.

paso 2. La célula B es activada por un linfocito T ayudante.

paso 3. La célula B se divide en dos células: plasmática y de memoria.

paso 4. La célula plasmática produce anticuerpos específicos para la bacteria invasora

paso 5. las células fagocíticas sienten o ven a las bacterias cubiertas de anticuerpos y se las comen.

paso 6 Una bacteria se pone en contacto con una célula de memoria que recordará a ese antígeno por mucho tiempo.

Conclusión:

Hemos delineado en este capítulo algunas características del SI que pueden ayudar a entender qué son los anticuerpos monoclonales que veremos en el próximo capítulo. Los lectores más valientes o curiosos pueden consultar libros más completos sobre el tema.

Glosario:

anticuerpo: proteína del suero que se forma en respuesta a la inmunización. Los anticuerpos se definen, en general, términos de su unión específica al antígeno inmunizante.

antígeno: cualquier material extraño al organismo que se une en forma específica a anticuerpos específicos o a linfocitos específicos. El término suele usarse también para describir a un material usado en una inmunización. Los **antígenos** pueden ser también inmunógenos que pueden gatillar una respuesta inmune o haptenos si no lo hacen.

carrier: molécula inmunogénica de gran tamaño o partícula a la que se encuentra unido un determinante antigénico de modo permitir al determinante convertirse en antigénico.

citoquinas o citocinas: sustancias solubles segregadas o secretadas por las células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos) que tienen variados efectos sobre otras células.

complemento: una serie de proteínas del suero involucradas en la mediación de la respuesta inmune. La denominada la cascada del complemento es disparada por la interacción del anticuerpo con un antígeno específico.

determinante antigénico: un sólo sitio antigénico o epitope/o en una molécula antigénica compleja o partícula.

epitope: término alternativo por determinante antigénico.

hapteno: un compuesto, generalmente, de bajo peso molecular que no es inmunógeno por sí mismo pero que conjugado a una proteína carrier o a una célula se convierte en inmunogénico e induce anticuerpos. Éstos anticuerpos pueden unirse al hapteno solo, en ausencia de carrier.

linfocitos B (células B): Precursores de las células productoras de anticuerpos.

Capítulo 9. Reactivos Biológicos: los anticuerpos



Joan Miró

Brevísima presentación

Los **anticuerpos** no sólo son componentes fundamentales del sistema inmune de los vertebrados sino que sirven como reactivos biológicos que se usan de rutina en muchos ensayos que se aplican tanto en el laboratorio clínico como en investigación. Los anticuerpos dirigidos contra un solo determinante antigénico denominados **anticuerpos monoclonales** son la base de la industria tecnológica moderna.

Un poco de historia

Edward Jenner (1749-1823), médico rural inglés, fue el primero en reconocer la posibilidad de proteger a las personas de una infección mediante la aplicación de un antígeno. Y, sin saberlo, incitar a la respuesta inmune humoral: **los anticuerpos**. En este caso el antígeno era un virus pariente del virus de viruela llamado viruela de las vacas que infectaba no sólo a las vacas sino que producía lesiones leves en los humanos. A este procedimiento lo denominó *vacunación* (ya que el material que usaba provenía de las vacas) en ¡1796! y resultó ser la forma más eficaz de proteger contra la viruela ([La viruela: peste del pasado amenaza del presente](#)) y el modelo inspirador de Luis Pasteur (1822-1895), el genio más grande de la Microbiología, para desarrollar vacunas contra el cólera de los pollos, el ántrax y el virus de la rabia. Tengamos en cuenta que para esa época no se sabía lo que era un virus ya que los virus se identificaron como tales en los comienzos del siglo XX.

Estos avances científicos no tenían una base teórica eran producto del **empirismo** (Capítulo 4) estaban basados en la observación y en algunas pruebas experimentales crudas e insuficientes para los criterios actuales.

Comenzado el siglo XX se inicia el verdadero desarrollo de la Ciencia inmunológica, está asociada a una larga lista de científicos premiados con el Nobel.

La estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (se abrevian Ig) son proteínas plasmáticas de alto peso molecular (150.000 a 900.000 **kDa**) (**capítulo 5**) que generalmente poseen cadenas de hidrato de carbono unidas a los aminoácidos y que se producen en respuesta a la presencia de un antígeno extraño al organismo. Arne

Tiselius (1902-1971) aplicó la técnica de la electroforesis a las proteínas del suero y encontró que los anticuerpos migraban junto a las γ - globulinas de ahí que en la actualidad anticuerpos e inmunoglobulinas sean sinónimos.

Se conoce la estructura física de los anticuerpos gracias a los trabajos de Edelman y Porter. El dibujo de la figura 9.1 muestra la estructura de las inmunoglobulinas o anticuerpos en forma de una **Y** griega. Con los distintos colores se intenta aclarar las características de estas moléculas.

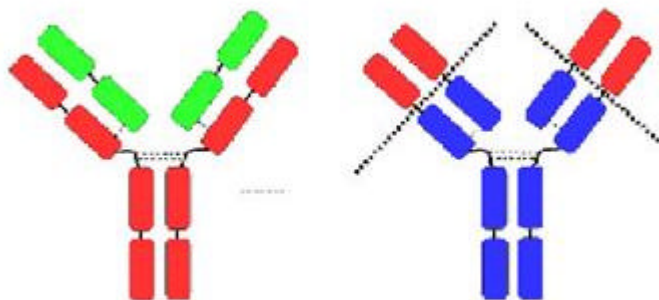


Figura 9.1. Estructura básica de los anticuerpos. En el diagrama de la izquierda se muestran en rojo las cadenas pesadas y en verde las livianas. El punteado en negro indica el enlace disulfuro. El dibujo de la derecha muestra en azul la región constante y en rojo la región variable.

En el dibujo de la izquierda se colorearon en rojo las cadenas denominadas pesadas (de mayor peso molecular), se trata de dos cadenas unidas entre sí por un puente disulfuro (ver aclaración más abajo) ellas constituyen el tronco o tallo de la **Y**, además, aparecen dibujadas como formadas por dos bloques. Éstos se conocen como dominios y son partes de la molécula que cumplen ciertas funciones. Las cadenas pesadas se bifurcan al llegar al puente disulfuro y forman los brazos externos de la **Y**. Las dos cadenas verdes denominadas livianas por su menor peso molecular están unidas cada una a la respectiva cadena pesada también por un puente disulfuro. El dibujo de la derecha reproduce la misma estructura del anticuerpo pero aquí con los dos colores se está indicando que todo lo marcado en azul es constante, esto quiere decir que todos los anticuerpos tienen esta región de aminoácidos que no cambia y en rojo se muestra la región variable, cuya composición en aminoácidos cambia de anticuerpo a anticuerpo.

Este concepto se aclara mejor en el análisis de la figura 9.2. La unidad básica de cada anticuerpo es un **monómero**. También hay anticuerpos diméricos, triméricos, tetaméricos etc. En resumen: la forma del monómero es una molécula con forma de **Y** que está constituida por dos cadenas pesadas idénticas (en rojo en el dibujo) y dos cadenas livianas idénticas (en verde) que están conectadas entre sí por puentes disulfuro. Estos puentes son uniones químicas entre dos átomos de azufre (-S-S-).

¿Qué les parece si simplificamos el dibujo de las inmunoglobulinas (Ig)? Veamos la figura 9.2 es bastante esquemática y fácil de entender, esta vez tenemos la **Y** acostada con las dos ramas apuntando hacia la izquierda. Las dos cadenas pesadas idénticas que aparecen como mirándose en un espejo están unidas por un puente disulfuro (dos átomos de azufre que por un lado se unen entre sí a través de una ligadura y con la otra ligadura (recuerden que el azufre tiene valencia dos) se toman de otro átomo de la respectiva cadena. Pueden ver también una vertical punteada que marca una parte de la molécula conocida como **F_c** (fragmento cristalizante). A su vez la parte de la cadena liviana (extremo de la **Y**, se denomina fragmento **F_{ab}** y es la región variable de la molécula que se adapta al antígeno que la provocó. El nombre del fragmento **F_{ab}** proviene del inglés y se refiere a la región de unión al antígeno (*fragment binding antigen*).

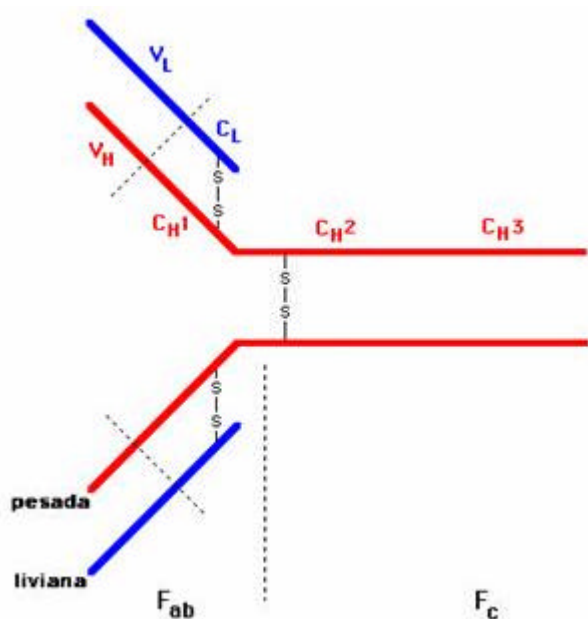


Figura 9.2

Si a un anticuerpo lo sometemos a la acción de una enzima llamada papaína o a otra llamada pepsina, la molécula de anticuerpo se divide en los fragmentos **F_c** y **F_{ab}**.

Resumiendo, la molécula de anticuerpo tiene dominios o regiones que están marcadas en el dibujo como **C_H** (1,2 y 3) eso quiere decir que hay seis regiones invariables o constantes sobre las cadenas pesadas y una sobre cada cadena liviana (**C_L**). Además hay regiones variables denominadas **V_H** (corresponde a la cadena pesada) y **V_L** a las livianas.

Notemos varias peculiaridades de esta molécula: a) el anticuerpo se unirá al antígeno por las dos puntas de la **Y** en consecuencia la unión es bivalente b) todos los anticuerpos tienen una estructura básica constante c) los cambios que caracterizan la especificidad del anticuerpo se deben a los fragmentos **F_{ab}**.

No es nuestro objetivo internarnos en la genética de los anticuerpos pero a esta altura podemos reflexionar que esta estructura peculiar de los anticuerpos con un tronco común y fragmentos **F_{ab}** diferentes explica en

gran parte la existencia de miles y miles de anticuerpos distintos que responden al reto de defendernos contra miles y miles de antígenos.

Los antígenos son estructuras complejas que presentan muchos determinantes antigénicos (regiones que son reconocidas por los anticuerpos). Esta propiedad convierte a los antígenos en **multivalentes** es decir que varias partes de su molécula pueden ser reconocidas por un anticuerpo en particular.

¿Cómo se obtienen los anticuerpos?

Hasta ahora nos referimos a los anticuerpos humanos, los que se forman como consecuencia de una infección natural o por vacunación. Pero para la mayoría de las reacciones en las que se utilizan los anticuerpos en el laboratorio se utilizan inmunoseros preparados en animales: ratones, conejos, cabras y otros.

Vamos a imaginar que queremos preparar anticuerpos contra glóbulos rojos (GR) humanos, tendremos que disponer de una solución pura de glóbulos rojos o eritrocitos extraídos de un hombre e inyectarlos en un ratón. Después de varias semanas el animal habrá fabricado anticuerpos contra los GR humanos, para obtener los anticuerpos sangraremos al ratón a blanco (esto quiere decir que obtendremos la mayor cantidad de sangre posible bajo anestesia general y con la premisa de no supervivencia del animal luego de esta operación, es decir que el ratón se duerme y ya no se despierta) y luego separaremos en una centrífuga los glóbulos rojos que sedimentarán dejando en el tubo usado un suero límpido que recogeremos con una pipeta. Es de esperar que este suero contenga las Ig contra los GR humanos y que al poner en contacto en un tubo de ensayo o en una placa el suero con los GR se producirá una reacción antígeno-anticuerpo (similar a la que ocurriría dentro del organismo), reacción que es posible visualizarla de modo directo. Procedimientos similares para obtener sueros inmunes se pueden realizar utilizando otro tipo de antígenos. Cuanto más puro es el antígeno más específicos serán los anticuerpos porque en una mezcla con impurezas se van a formar anticuerpos contra todas las sustancias antigénicas presentes. **Hay algo muy importante que mencionar: los anticuerpos, al ser proteínas, también se pueden emplear como antígenos en una reacción, es decir que se pueden generar anticuerpos contra ellos.** Así, si un conejo se inocula con Ig de ratón formará anticuerpos contra la Ig de ratón. Este hecho es fundamental para la aplicación de los **inmunoensayos**.

Ensayos inmunes: resultado de la interacción antígeno-anticuerpo

El término **afinidad** se utiliza para describir la fuerza de la unión entre el sitio de unión del anticuerpo y el sitio de su unión al antígeno que ya sabemos que se conoce con el nombre de **epitope**, **determinante antigénico** o **hapteno**. Hay un valor matemático referido a esta unión denominado constante de asociación que es el valor que mide la fuerza de unión. Como mencionamos antes, los antígenos son multivalentes y los anticuerpos también, esta multivalencia tiende a aumentar la afinidad funcional o **avidéz**.

Reacción de aglutinación

Si mezclamos glóbulos rojos (1) o esferitas de látex recubiertas de antígenos de estos glóbulos rojos (1) con anticuerpos anti-glóbulos rojos (2) se produce la reacción Ag-Ac (3) y los GR o las esferitas quedan recubiertas y ligadas a los anticuerpos (Ig). Si se emplean GR, por ejemplo, se obtiene una reacción invisible al ojo que puede hacerse visible por el agregado de otros anticuerpos dirigidos contra la Ig (4) (figura 9.3) Como resultado se formará (5) una red de interconexión produciendo un conglomerado visible al ojo. Cuando se trata de GR en el tubo de vidrio aparecerá en el fondo una línea o un pseudo-tejido rojo si se usaron los GR perfectamente visible y diferenciable formado por un sedimento de GR.

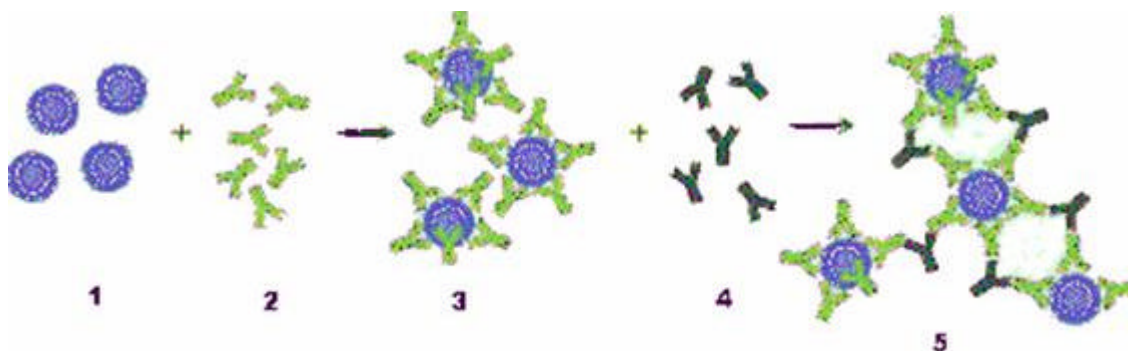


Figura 9.3.

Los anticuerpos anti-GR se conocen con el nombre de hemolisinas porque si en el tubo de ensayo se agrega **complemento** (ver capítulo 8) se produce la hemólisis de los GR. Esta reacción tan simple y tan bella de observar ha sido y es todavía la base de la reacción conocida como **fijación del complemento** que tiene aplicación en la clínica y en estudios de laboratorio, aunque en investigación la reacción de complemento ha caído en desuso debido a la aparición de técnicas más sofisticadas y sensibles.

La reacción de aglutinación con GR también puede servir como reacción indicadora de la presencia de anticuerpos contra un antígeno determinado por medio de la visualización de una reacción positiva o negativa entre un antígeno-anticuerpo.

Vamos a suponer que queremos saber si una mujer tuvo una infección con virus de rubéola, obtenemos suero de la mujer, separamos las células de la sangre (GR, leucocitos y plaquetas) e investigaremos la presencia de anticuerpos contra el virus de rubéola en el suero de esta mujer. Para ello pondremos en contacto el suero con antígeno de rubéola que podrá ser el virus entero o purificado. ¿Qué puede ocurrir?. Si en el suero hay anticuerpos específicos se van a unir con el antígeno dando una reacción positiva y si no hay anticuerpos la reacción será negativa. En el primer caso al agregar complemento, éste se va unir al complejo virus rubéola-anticuerpos antirrubéola y como tal al ser capturado no estará disponible para interactuar con otro complejo antígeno-anticuerpo. Por eso si a la mezcla anterior (que ha consumido el

complemento) le agregamos una preparación GR y anti-GR (puede ser tomado como otro reactivo biológico en esta técnica) se va a producir la reacción como se ve en 3 de la figura 9.3.

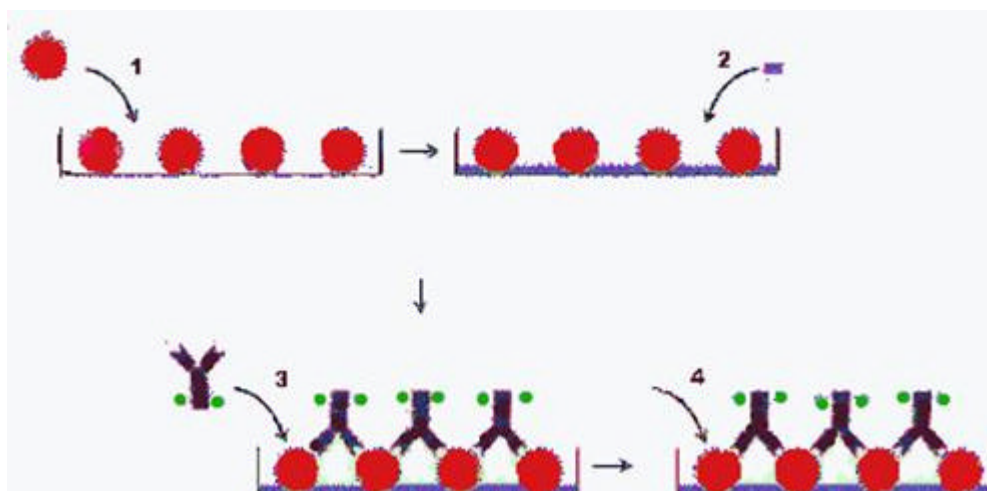
Atentos al aparente rompecabezas: si al cabo de incubar a 37° por un rato se ve un botón rojo en el fondo de la placa de reacción, los GR de ese reactivo biológico (GR-anti-GR) están intactos aún cuando tengan unidos sus anticuerpos específicos y la reacción será positiva para el virus de rubéola porque el complejo antígeno de rubéola- anticuerpo antirrubéola tiene capturado al complemento. Si en cambio, los GR se hemolisaron es porque había complemento libre (no hubo reacción) y se consumió para la unión GR-antiGR y en consecuencia **No hubo infección con rubéola.**

Resumiendo: Antic.antirrubéola + antígeno rubéola = + (si no hay hemólisis)

Antic.antirrubéola + antígeno rubéola = ?(si hay hemólisis)

ELISA – (*Enzyme linked immunosorbent assay*) o ensayo inmunoabsorbente de unión a una enzima, es un ensayo de gran aplicación tanto en el laboratorio clínico como en investigación. Sepamos, por ejemplo, que es el ensayo más usado para determinar la presencia de proteínas del virus HIV en el suero de posibles infectados. Existen dos tipos de ELISA los llamados directos como se muestra en la figura 9.4 y los indirectos figura 9.6. La base fundamental de la reacción de ELISA es la unión del antígeno a un anticuerpo específico, el revelado de la reacción entre el anticuerpo y el antígeno tiene lugar porque los anticuerpos se han conjugado (unido) a una enzima que al reaccionar con su sustrato da una reacción coloreada. En la figura 9.5 se muestra una placa de ELISA revelada con un sustrato que vira al color azul. No nos importa qué componentes hay en la placa, sólo sirve para que aprecien lo que son las placas de ELISA y que observen que en los pocillos coloreados hay una reacción positiva de unión entre un anticuerpo y un antígeno.

Figura 9.4. Esquema de una reacción de ELISA.



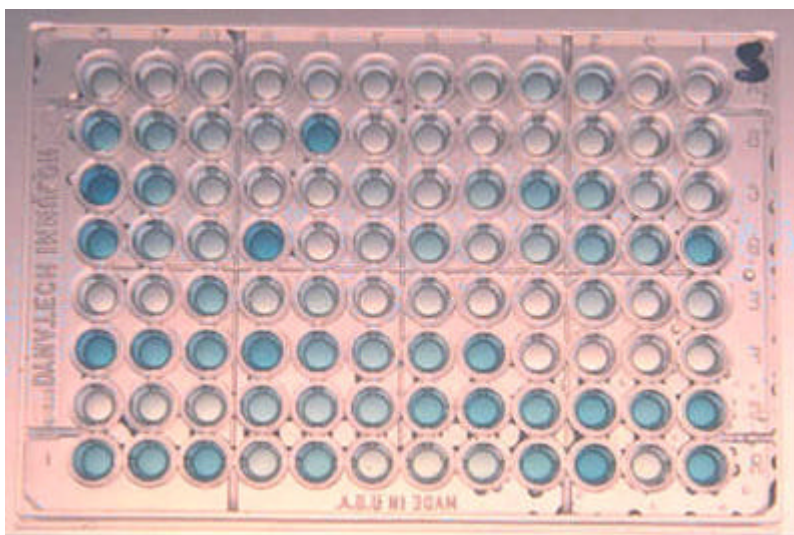
1. antígeno que se pega al fondo de una placa de plástico
2. proteína bloqueante que cubre el plástico libre sin recubrir por el antígeno
3. anticuerpo marcado con una enzima (puntos verdes)
4. sustrato

En primer lugar se dejan adsorber las partículas del antígeno (representadas con bolitas rojas) al fondo de la placa de plástico, generalmente se usan placas con pequeños pozos o pocillos. Para evitar pegadas inespecíficas se agrega una proteína (en azul) que va a cubrir el resto de la placa. Una vez que se ha pegado el antígeno se agrega el anticuerpo, este anticuerpo tiene la particularidad de estar unido a una enzima (puntos verdes), luego que esto ocurre se agrega un reactivo sobre el que reaccione la enzima produciendo un compuesto coloreado. La lectura del color se puede hacer a simple vista o recurrir a un espectrofotómetro que medirá la intensidad del color.

Algunos datos: las enzimas utilizadas suelen ser la peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina. La proteína que se usa para bloquear los sitios donde no hay antígeno puede ser simplemente leche.

Lectura de la reacción: la reacción es positiva cuando aparece el color ¿por qué?. La respuesta es fácil si hay unión antígeno-anticuerpo la enzima quedará pegada aun después de varios lavados y al reaccionar con el sustrato virará al azul. Si la reacción es negativa es simplemente porque no hubo unión antígeno-anticuerpo y los lavados intermedios se llevaron el anticuerpo suelto no unido.

Figura 9.5 Fotografía de una placa de ELISA revelada para la enzima



ELISA indirecto

En la Figura 9.5 se muestra un esquema de un ELISA indirecto.

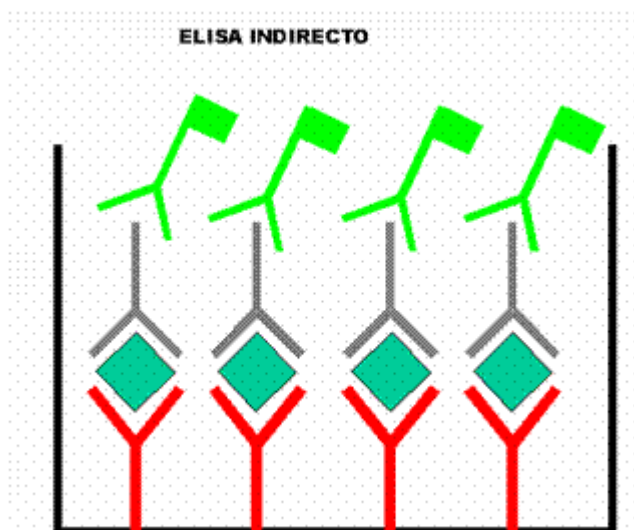


Figura 9.5.

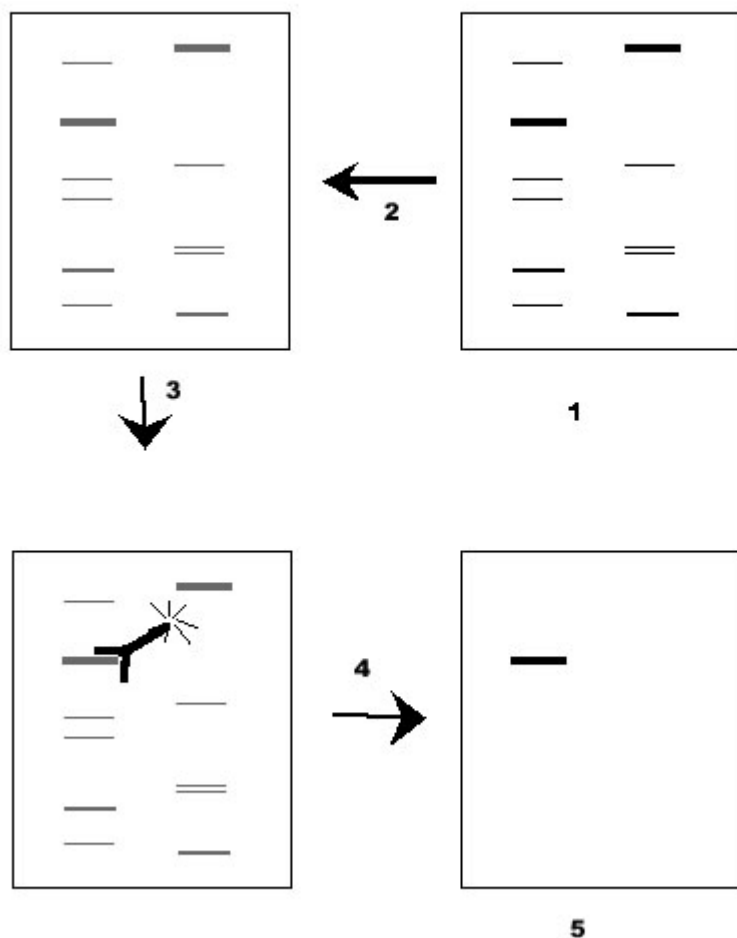
En esta reacción se usan dos tipos de anticuerpos contra el mismo antígeno, el rojo se pega a la placa y sirve de anclaje al antígeno, el segundo es para revelar la presencia del antígeno ya que se encuentra unido a una enzima u otro reactivo que pueda ser revelado. Si el antígeno se pegó al anticuerpo dará positivo porque el segundo anticuerpo también se pegará. La reacción dará negativa si los anticuerpos usados primero no se unieron al antígeno.

Reacciones de precipitación antígeno-anticuerpo

A veces cuando un anticuerpo soluble reacciona con un antígeno soluble y se forma el complejo antígeno-anticuerpo se produce un precipitado. Estos precipitados pueden visualizarse en geles de agarosa por la técnica de inmunodifusión. Les dejamos el ejercicio de averiguar en qué consisten esas técnicas de difusión simple o doble y pasaremos a explicar una técnica moderna conocida con el nombre de **Western blot**. Esta es una de las técnicas de mayor uso en el diagnóstico de infección por el virus HIV aunque no se trata de una aplicación única, se la usa en diagnóstico clínico y en investigación. Este ensayo también permite determinar el peso molecular de una proteína y medir la concentración relativa de una proteína en una muestra.

Western Blot (inmunotransferencia de proteínas)

En estos ensayos el antígeno es sometido primeramente a una electroforesis y luego es transferido a un tipo de papel o membrana de ciertas características (nitrocelulosa u otras), de modo que el papel es la fase sólida a la que se une el antígeno. La figura 9.6 muestra esquemáticamente el método.



Veamos los pasos sucesivos de la reacción:

- 1) Las proteínas son separadas en una electroforesis en un gel donde se sembró la mezcla de proteínas (electroforesis en gel). En general se utiliza la técnica de SDS-PAGE (ver explicación en el glosario).
- 2) Las proteínas se transfieren (mediante el uso de otra electroforesis o por capilaridad) al papel de nitrocelulosa, se puede observar que se mantiene el patrón de las proteínas, es decir el número de bandas y su posición.
- 3) El papel de nitrocelulosa se incuba con una solución de proteínas bloqueante, por ejemplo con leche, para que cubra o se pegue en toda la superficie de la nitrocelulosa libre. Luego se agrega a la solución un anticuerpo que se unirá a una de las proteínas, este anticuerpo lleva pegada una enzima (recuerden el ELISA) o un colorante. Aunque por ahora no se ve nada.
- 4) La localización de la banda a la que se unió el anticuerpo se realiza cuando se incuba con una solución del sustrato para esa enzima que lo convierte en un producto coloreado visible a simple vista y que se puede fotografiar si uno desea guardar una copia de los resultados.

Conclusión:

El uso de los anticuerpos como reactivos biológicos ha permitido el avance de un gran número de investigaciones y ha encontrado inmediata aplicación en el campo del diagnóstico de numerosas enfermedades.

Glosario:

Afinidad: Es una medida de la constante de unión entre un solo sitio de combinación del antígeno con un determinante antigénico monovalente presente en el anticuerpo.

Aglutinación: Es la agregación de antígenos de antígenos particulados por medio de anticuerpos. El término se aplica a los glóbulos rojos, las acterias o partículas inertes recubiertas de antígeno.

Anticuerpos: Son proteínas del suero que se forman en respuesta a la inmunización.

Antígeno: Cualquier material extraño que se une en forma específica a anticuerpos específicos o a linfocitos específicos. Los antígenos pueden ser también inmunógenos si son capaces de disparar una respuesta inmune o haptenos si no lo hacen.

Centrífuga: Máquina que separa los distintos componentes de una mezcla por la acción de la fuerza **centrífuga**. Ésta es una fuerza de inercia que se manifiesta en todo cuerpo hacia fuera cuando se le obliga a describir una trayectoria curva. Es igual y contraria a la centrípeta.

Dominios: Cuando se estudia la estructura terciaria de una proteína se encuentran regiones de plegamiento independiente denominadas dominios que se caracterizan por tener funciones específicas.

Electroforesis Si se aplica un campo eléctrico a una solución que contiene una molécula con carga neta (+ o -), ésta migrará a una velocidad que depende del valor de su carga, su tamaño y su forma. Esta técnica, denominada **electroforesis** se utiliza para separar mezclas de moléculas cargadas (proteínas, ácidos nucleicos), ya sea sobre un soporte (papel, cellogel) o dentro de un gel (agarosa, almidón o poliacrilamida). Generalmente se realiza la técnica de SDS-PAGE que consiste en agregar a la mezcla de corrida el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) este detergente elimina la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas y deja solo la cadena primaria de aminoácidos. PAGE: es la abreviatura de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Enzima: Proteína que cataliza específicamente cada una de las reacciones bioquímicas del metabolismo.

Espectrofotómetro: Aparato que mide la cantidad de luz absorbida por una sustancia en disolución y compara intensidades espectrales con respecto a una longitud de onda.

Hemólisis liberación de la hemoglobina de dentro del GR por ruptura de la membrana que lo forma.

Hibridoma: Una célula híbrida que resulta de la fusión de una célula secretora de anticuerpos con una célula maligna. La progenie (descendencia) produce (secreta) anticuerpos sin estimulación y prolifera continuamente tanto in.vitro como in vivo.

Sustrato: se denomina así a la solución que contiene un compuesto sobre el cual actuará una enzima: Por ejemplo: las enzimas que cortan las cadenas de proteínas como la papaína tienen como sustrato una solución de proteína.

Virar: se refiere a la propiedad de un líquido de cambiar de color. Por ejemplo: hay colorantes que tienen un color en medio ácido y lo cambian en medio alcalino.

Capítulo 10. Los anticuerpos monoclonales

Brevísima historia.

En 1975 Georges Köhler y el investigador argentino César Milstein fusionaron por primera vez linfocitos con células de un mieloma y obtuvieron un hibridoma: una línea celular inmortal capaz de producir anticuerpos específicos (monoclonales). Por este trabajo, que no patentaron, recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. La importancia de la producción de anticuerpos monoclonales no se evidenció hasta 1987 cuando estos anticuerpos se produjeron en forma regular en ratones y fueron utilizados en el diagnóstico ya que son anticuerpos de pureza excepcional capaces de reconocer y unirse a un antígeno específico.

Los anticuerpos monoclonales se utilizan de rutina en muchos procedimientos diagnósticos como por ejemplo:

- mediciones de niveles de proteínas y drogas presentes en el suero
- tipificación de tejidos y de sangre
- identificación de agentes infecciosos
- tipificación de leucemias y linfomas
- identificación de antígenos tumorales
- identificación de células específicas involucradas en la respuesta inmune.
- identificación y cuantificación de hormonas.

¿Cómo surgió la idea de obtener anticuerpos monoclonales?

Qué mejor respuesta que recurrir a las palabras del Dr. Milstein¹:

“Imaginemos una gran mezcla de sustancias químicas entre las cuales nos interesa sólo una de ellas. Una sustancia entre millones y millones. Es como una aguja en un pajar. Si tenemos un anticuerpo específico contra una sustancia, ese anticuerpo puede funcionar como un imán capaz de ignorar la existencia del pajar y reconocer exclusivamente la aguja. A los ojos de un anticuerpo, el pajar no existe. Este simple concepto dio lugar a lo que se dio en llamar Inmunoensayos (ver capítulo 9) que permitieron la medición precisa de hormonas y otras muchas sustancias no sólo en medicina sino en química analítica en general. Los inmunoensayos introdujeron los anticuerpos para su uso como herramienta analítica de importancia fundamental en áreas que nada tenían que ver con la inmunología. El problema era que para preparar un anticuerpo específico era necesario utilizar agujas puras”.

Algo más sobre los anticuerpos

Vimos en el **capítulo 9** la estructura básica de los anticuerpos, vamos a repasar y agregar aquí, una serie de conocimientos sobre esas moléculas mágicas. Las inmunoglobulinas o anticuerpos o abreviados (Ab) son una mezcla heterogénea de proteínas que presentan dos tipos de variaciones estructurales. Cambios sutiles en la estructura de los sitios de combinación al antígeno (**regiones variables**) que determinan la **especificidad** de unión al antígeno (reconocimiento de un antígeno entre varios parecidos) y diferencias estructurales fuera de la región de unión al antígeno, en las llamadas regiones constantes que se relacionan con otras funciones del anticuerpo denominadas **efectoras**. Estas actividades efectoras son por ejemplo: activar al complemento o unirse a más de un receptor conocido con el nombre de Fc que están presentes en las membranas de los monocitos y granulocitos (**ver capítulo 7**). Existen cinco clases de inmunoglobulinas que además de las IgG incluyen a las **IgA**, **IgD**, **IgE**, e **IgM**. Cada clase de anticuerpos se distinguen entre sí por algunas de sus funciones efectoras y constitución estructural. No vamos a complicar las explicaciones pero para dar una idea concreta diremos que el primer tipo de anticuerpos que aparece en una persona infectada con un virus es del tipo IgM y que recién pasado cierto tiempo aparecen las IgG que son más duraderas. Como las moléculas son estructuralmente diferentes se pueden distinguir fácilmente mediante procedimientos de rutina en el laboratorio clínico.

Esta situación es vital para el diagnóstico clínico. Volviendo al virus de la rubéola si una mujer embarazada tiene un contacto con un enfermo de rubéola es importante averiguar si ya está protegida o no. Si se le detectan anticuerpos IgM se trata de una infección reciente y hay que preocuparse por el porvenir del bebé ya que el virus de rubéola es teratogénico (puede producir malformaciones en el embrión). Si la mujer tiene anticuerpos IgG la infección fue anterior y no hay de qué preocuparse.

Modo de obtención de los anticuerpos monoclonales.

Problemas que hubo que resolver:

Pasaje de la heterogeneidad a la homogeneidad o del anticuerpo policlonal al anticuerpo monoclonal.

Mientras algo de la heterogeneidad de los anticuerpos deriva de la existencia de clases y subclases de Ig lo más importante radica en la naturaleza polimórfica de sus regiones variables. Se han hecho estimaciones del número de anticuerpos diferentes que pueden producir las células B del organismo y se llega al fantástico número de más de 10 millones.

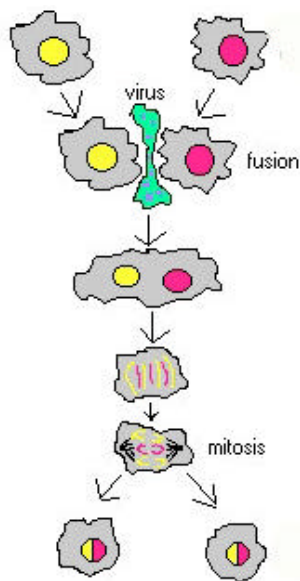
En resumen: la respuesta del sistema inmune a cualquier antígeno por más simple que sea éste, es una respuesta policlonal. Lo que quiere decir que el sistema fabrica anticuerpos contra un rango amplio de estructuras presentes en el antígeno que involucran tanto a la región de unión al antígeno como a las zonas efectoras. Por otro lado, MacFarland Burnet (premio Nobel 1960) postuló la teoría clonal de la generación de

anticuerpos es decir la generación de moléculas idénticas en su estructura y en su capacidad de reconocer a un antígeno (**¡qué alivio!, gracias a Dolly todos saben qué es un clon**).

Cada célula plasmática B (clon B) fabrica un solo tipo de anticuerpo. Este hecho vino en ayuda de Milstein y Köhler que pensaron que si aislaban clones de células B y las cultivaban en placas de plástico de cubetas múltiples, el anticuerpo que producirían las células sería monoclonal. Pero... había un gran inconveniente, las células B mueren a los pocos días de ser cultivadas *in-vitro*. Entonces, se les ocurrió que si las fusionaban con una célula con potencial de inmortalidad, los híbridos de ambas células podrían fabricar anticuerpos monoclonales casi indefinidamente. Efectivamente fue así, obtuvieron **hibridomas** la clave para producir anticuerpos monoclonales.

Fusión celular

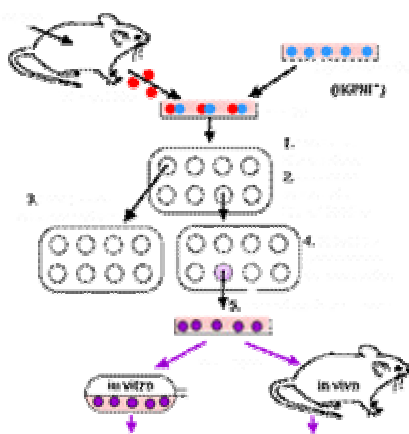
La fusión celular es un procedimiento que permite que dos células se fusionen entre sí al poner en contacto sus membranas externas citoplasmáticas. En el esquema que sigue se muestra el caso de la fusión celular mediada por un virus, pero también se puede producir la fusión por otros métodos utilizando algunos reactivos químicos. A los efectos de entender el procedimiento vale tanto un virus como una sustancia química. Como vemos hay dos células cuyos diferentes ADN nucleares se pintaron en amarillo y rojo para diferenciarlos. La fusión de las membranas permite la obtención de una célula con dos núcleos. Cuando se produce la mitosis algunas de las células hijas van a heredar los cromosomas de ambos padres, estos son los hibridomas.



Células de mieloma.

Una célula B, como cualquier célula del organismo, puede convertirse en cancerosa, cuando esto ocurre la proliferación de un cultivo de estas células *in-vitro* se mantiene por períodos prolongados, casi para siempre, a menos que alguna razón accidental lo impida. Köhler y Milstein para salvar el escollo de la vida efímera de las células B en cultivo tuvieron la idea de fusionarlas con células de un mieloma. De este modo combinaron el potencial de crecimiento ilimitado con la especificidad de un anticuerpo producido por células normales B presentes en el bazo de un ratón inmunizado. Esta técnica se conoce con el nombre de **hibridación de células somáticas** que da lugar a un **hibridoma**.

El procedimiento se detalla en el dibujo siguiente. Se inmuniza un ratón con un antígeno, al cabo de un tiempo se sacrifica, se extrae el bazo, se separan las células y se cultivan *in-vitro* en placas de plástico u otro material apropiado (circulitos rojos). Se dispone de un cultivo de células de un mieloma (circulitos azules) y se procede a fusionar ambos cultivos.



Anticuerpos monoclonales

Ahora hay que seleccionar los clones que sean hibridomas (1) y esto no es tan simple como hacer puré de papas. Las células de mieloma que eligieron los investigadores perdieron la capacidad para sintetizar la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa. (**HGPRT**). Por eso son **HGPRT⁻** (negativas para HGPRT) (ver dibujo) y a raíz de ello se cultivan en un medio especial llamado **HAT** (contiene hipoxantina/ aminopterina/ timidina) porque la enzima de la que carecen las células sintetiza purinas utilizando como fuente precursora a la hipoxantina. La ausencia de la enzima no perjudica el crecimiento de estas células de mieloma ya que en ausencia de la enzima utilizan un camino metabólico alternativo para sintetizar purinas. Sin embargo, la presencia de aminopterina en el medio HAT anula la posibilidad de sobrevivir y hay una total dependencia del compuesto (**HGPRT**).

¿Qué va a ocurrir después de la fusión y cultivo en medio carente de **HGPRT**? Las células de mieloma no fusionadas no pueden crecer porque carecen de la enzima **HGPRT**, las células provenientes del

bazo no pueden multiplicar porque tienen una vida corta en cultivo. Sólo van a persistir los hibridomas porque tienen la enzima **HGPRT** heredada de las células del bazo y las de mieloma aportan la inmortalidad.

En el paso 2 se prueban los sobrenadantes por la presencia de los anticuerpos deseados. Debido a que los cultivos iniciales de hibridomas se pudieron haber iniciado con más de un clon es necesario clonar nuevamente los cultivos productores de anticuerpos y subcultivarlos (paso 3). En el paso (4) se testean los cultivos por la presencia de anticuerpos y dado que las células productoras constituyen un clon los anticuerpos son monoclonales lo que significa que cada cultivo secreta una sola clase de molécula de anticuerpo dirigida a un solo determinante antigénico de un antígeno preseleccionado. A continuación (paso 5) se realiza un escalamiento (cultivo mayor) de los hibridomas, que cultivados apropiadamente, se mantendrán para siempre ya sea *in-vitro* con un rendimiento de 10-60 mg/ml o *in-vivo* en un ratón en el que la concentración de anticuerpo en el suero puede alcanzar valores de 1-10 mg /ml. Sin embargo, hay que tener en cuenta que hay un movimiento mundial tendiente a no utilizar animales en investigación que combate activamente el uso de ratones.

Tecnología de la producción de anticuerpos monoclonales (AbM) y aplicaciones.

Como vimos el primer paso para producir AbM es inmunizar a un ratón con un antígeno. Cuando el ratón comienza a producir anticuerpos contra el antígeno se le remueve el bazo. Luego se fusionan las células del bazo con células de una línea de mieloma que no sea productora de anticuerpos y que se mantenga en cultivo. La nueva línea celular proveniente de la fusión que sí produce anticuerpos se inyecta en el peritoneo de otro ratón y el fluido ascítico que contiene los anticuerpos se cosecha.

Entre los factores que afectan la pureza del antígeno se encuentran la edad, el sexo del ratón y la tolerancia inmunológica de cada animal y otros factores que afectan la producción, por eso se estila utilizar adyuvantes para estimular la respuesta inflamatoria.

Test de ELISA y aplicaciones.

Este ensayo biológico descrito en el **capítulo 9** fue desarrollado por Engvall y Perlman en 1971. En este ensayo con anticuerpos monoclonales éstos se pegan a la superficie de la placa plástica. La presencia de este anticuerpo se detecta mediante el uso de un anticuerpo policlonal unido a un producto coloreado, si el test es positivo para el monoclonal aparece el color. Los usos comerciales de estos ELISA son de gran demanda así por ejemplo: el test o prueba de embarazo consiste en un anticuerpo monoclonal preparado contra una proteína presente en la orina de mujeres embarazadas. A esto podemos agregar *tests* para diabetes, para la presencia de antibióticos residuales en la leche y otros.

Otras aplicaciones, no tan universales como las que se han descrito, es utilizar los anticuerpos monoclonales como proyectiles dirigidos a los receptores de la membrana de las células cancerígenas, asociados a sustancias radiactivas para matar las células.

Nos queda recorrer un solo tema, la humanización de los anticuerpos monoclonales, como estos anticuerpos se producen en el ratón puede que administrados al hombre con fines terapéuticos, su organismo los rechace, para eso se ha aplicado ingeniería genética y se han unido regiones de los genes que codifican por la proteína de mieloma humano con regiones de un anticuerpo de ratón. Pero la explicación detallada de estas técnicas no las consideraremos aquí. La tecnología del ADN amerita la escritura de nuevos capítulos.

Glosario.

adjuvante: una sustancia que ayuda a aumentar la respuesta antigénica produciendo una inflamación que retiene al antígeno en el sitio de inoculación

fluido ascítico: líquido de características similares al suero que se acumula por extravasación en la cavidad peritoneal del abdomen.

hipoxantina: derivado natural de una purina raramente se la puede encontrar formando parte de la cadena de ADN.

mieloma: tumor de células B que se origina en la médula ósea.

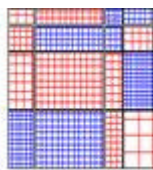
purina: compuestos orgánicos aromáticos heterocíclicos que forman los ácidos nucleicos. En el ADN existen dos bases purínicas que son la adenina y la guanina.

secretar: segregar.

1. César Milstein. Los anticuerpos monoclonales. La curiosidad como fuente de riqueza. Conferencia dictada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 15 de diciembre de 1999.

[http:// www.educ.ar](http://www.educ.ar)

Capítulo 11. Visualización de los resultados experimentales



Qué y cómo graficar.

Cuando se realizan trabajos de investigación siempre se trata de expresar los resultados en números porque la expresión cuantitativa permite un análisis objetivo que apoye o rechace la hipótesis de trabajo.

Inicialmente, los valores obtenidos son compilados en tablas o **bases** de datos, pero luego, y siempre que sea posible, conviene convertirlos en una forma de representación gráfica porque resulta difícil interpretar las relaciones existentes entre los datos compilados en una tabla o cuadro. Los gráficos, por el contrario, permiten una interpretación rápida de los resultados. Independientemente del tipo exacto de gráfico, la creación de una visualización clara y comprensible de datos tiene una importancia fundamental en todas las ramas de la ciencia. De la misma manera, la lectura e interpretación de gráficos es una habilidad primordial a todos los niveles, desde el estudiante que recién se inicia al científico experimentado. Los gráficos son componentes fundamentales de los **trabajos** de publicación científicos, en los que los nuevos datos se presentan rutinariamente. A pesar de que las tablas son necesarias para anotar datos, los gráficos le permiten al lector visualizar complejas series de datos de una manera simple y concisa.

La forma de una curva, por ejemplo, nos dice en forma inmediata si hay una relación directa entre las variables, una tendencia hacia adónde evolucionarán los datos aún cuando no se haya cubierto todo el espectro. Además las curvas permiten comparar entre experimentos similares. De todos modos a medida que se experimenta se va adquiriendo la habilidad necesaria para elegir cuál es la mejor forma de representación. Son importantes los criterios de selección de una forma gráfica que permita una lectura con claridad y facilite la comparación.

En la expresión escrita o en la exposición oral de un trabajo científico se alternan gráficos, tablas, esquemas, dibujos, gráficos generados por computadora y/o fotografías obtenidas con el microscopio de luz, electrónico o por toma directa.

En la actualidad la representación gráfica se ha simplificado por el uso de *software* que permite la producción de las diferentes formas en que se pueden agrupar los datos: tortas, barras o columnas, líneas y otras. Pero el programa debe responder al criterio del investigador que decidirá cuál es la forma correcta y más simple de graficar para poder interpretar los resultados. No vamos a realizar un estudio exhaustivo del tema, sino que, mediante algunos ejemplos pretendemos orientar a los lectores de este curso a desarrollar criterios para seleccionar los modos más apropiados para expresar resultados experimentales. Para la representación de los gráficos hemos utilizado el programa de Microsoft Excel para MacOs 9.1.

Gráfico en forma de torta

Se trata de un gráfico circular que provee un concepto visual de un todo, de modo que el 100% es igual a 360 grados. La torta se divide en segmentos, cada uno de ellos corresponde a la categoría o clase de la variable representada. El tamaño de los segmentos es proporcional al porcentaje de la categoría correspondiente. En una torta se pueden agrupar datos de categorías específicas (conocidas también como variables cualitativas) que pueden ser **variables ordinales** o **variables nominales**. Ejemplo: una variable ordinal puede ser la altura porque refiriéndose a una persona puede ser alto, mediano o bajo que guardan entre sí un orden aunque las distancias entre los valores no estén definidas. La variable nominal describe un nombre, rótulo o clase entre las que no hay un orden natural en consecuencia se pueden colocar en cualquier orden.

Ejemplo 1.

Se dispone de un alimento húmedo que se analiza para conocer la concentración y composición relativa % de sus componentes. Los datos se calcularon analizando 200g de alimento. Resulta claro que el tipo de variable representada es nominal.

Cuadro 1. Composición nutricional de un alimento húmedo.

Clase	Peso en gr	%
carbohidratos	88	44
proteínas	54	27
grasa	22	11
agua	36	18

Los datos de las columnas 1 y 3 señalados con sombra verde los volcamos aun gráfico en forma de torta plana. (Figura 1).

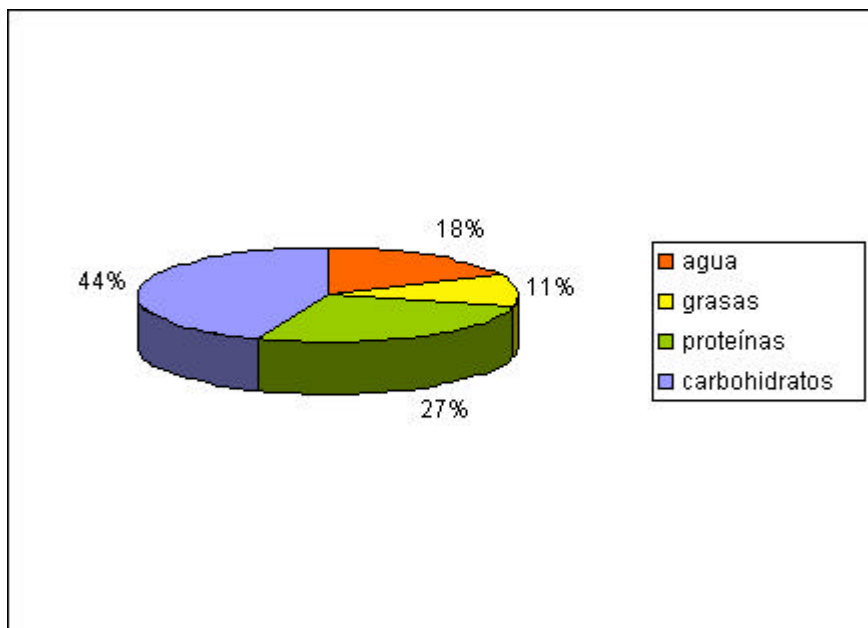


Figura 1. Composición relativa por ciento de un alimento.

Se puede visualizar rápidamente que casi la mitad del alimento está constituido por hidratos de carbono.

La figura 2 muestra lo mismo pero utilizando una torta tridimensional, a mi criterio esta representación es más atractiva, pero es más fácil de interpretar la de la figura 1.

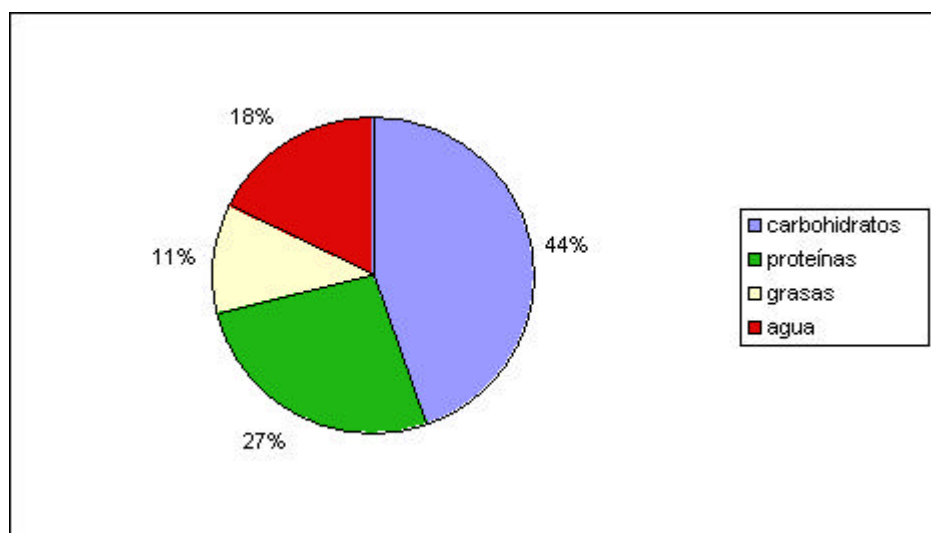


Figura 2. Composición relativa por ciento de un alimento

Es muy importante que los valores figuren al lado de cada porción y no en el cuadro de referencias. Existen otro tipo de representaciones dentro del grupo de las tortas en las que las porciones aparecen separadas como se ve en la figura 3.

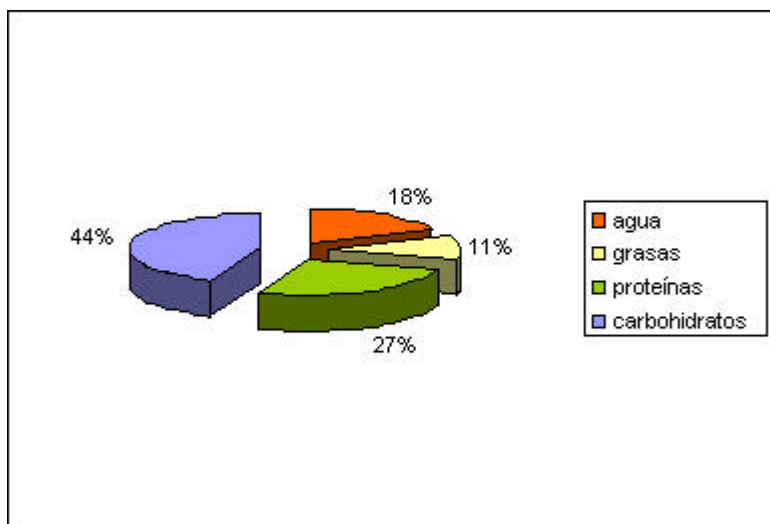


Figura 3.

Esta representación no ofrece ventajas respecto de las figuras 1 y 2 salvo en los casos en que se pueda graficar resaltando sólo una porción que se quiere destacar. El programa usado no permitió esta representación pero existen otros que sí lo permiten.

Ejemplo 2.

Cuando el número de variables es superior a 4 o 5 la representación en forma de torta se vuelve más confusa, sobre todo si hay componentes en proporción muy baja. La figura 4 es la representación gráfica de los datos del cuadro 2.

Cuadro 2. Composición nutricional de 100 gr de un alimento seco

Clase	Proporción porcentual (%)
carbohidratos	50
proteínas	30
grasas	2
fibra alimenticia	16
vitaminas	1
minerales	1

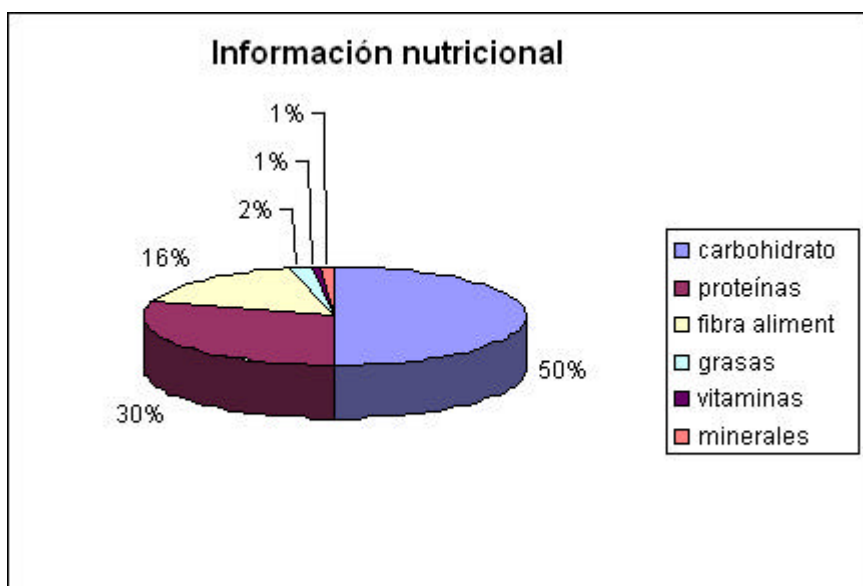


Figura 4. Representación gráfica de la composición porcentual del alimento.

La representación no es apta para visualizar las porciones más pequeñas de la torta. Existen otro tipo de representaciones como las de forma de rosca (doughnut) como se ve en la Figura 5.

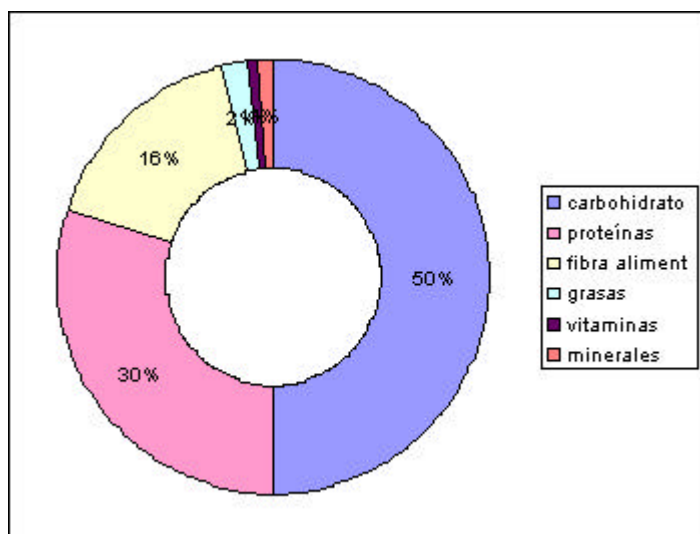


Figura 5. Representación porcentual de los datos del cuadro 2.

Nuevamente la proporción de los componentes minoritarios no permite su visualización correcta en este caso la confusión es mayor por la superposición de los datos de porcentaje. Para mejorar la representación como se muestra en la Figura 6 fue necesario alterar el orden de ingreso de los datos en el programa y cambiar por colores más claros. La visualización cambia y permite la mejor comparación.

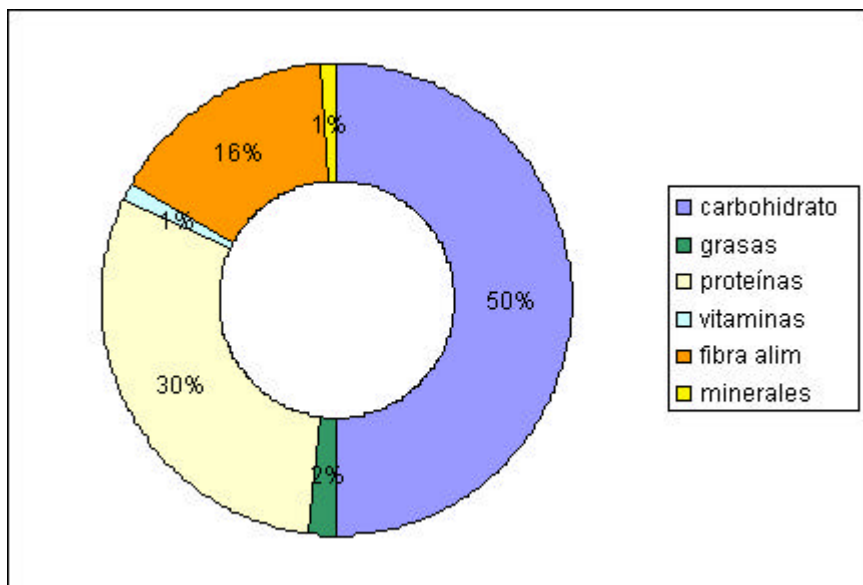


Figura 6. Representación de los datos del cuadro 2.

Gráfico de barras.

Un gráfico de barras puede ser horizontal o vertical pero lo más importante es tener en cuenta la altura o longitud (horizontal) de la barra, cuanto mayor es su altura o su longitud, mayor es el valor que representan. Los gráficos de barras representan variables de categorías o numéricas. Vamos a representar un gráfico de barras con los datos del cuadro 1, vamos a obtener el gráfico de la figura 7.

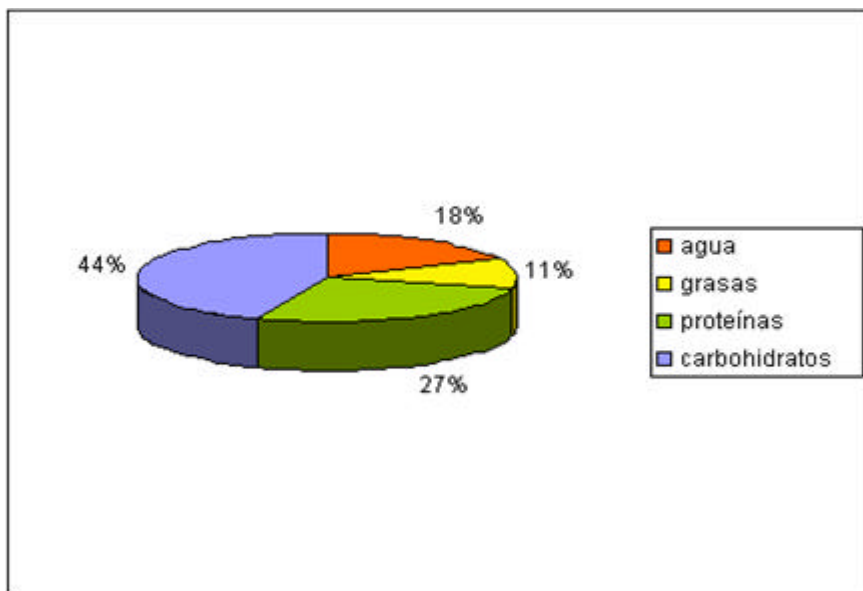


Figura 7. Composición relativa por ciento de un alimento (datos del cuadro 1)

Como podemos observar el gráfico de barras dimensiona los valores según dos ejes, el vertical es la ordenada y el horizontal es la abscisa. Dicho de otra forma: el vertical es el eje Y y el horizontal el eje X. La altura de las barras se construyó con los valores de la columna 3 del cuadro 1. Aquí no es necesario que las barras tengan colores distintos ya que se ve claramente la diferente proporción de los componentes del alimento y su proporción está dada por el valor que se lee sobre el eje de las X. La variable X es en este caso de carácter nominal. En la figura 8 se muestra el mismo resultado pero las barras aparecen en tres dimensiones.

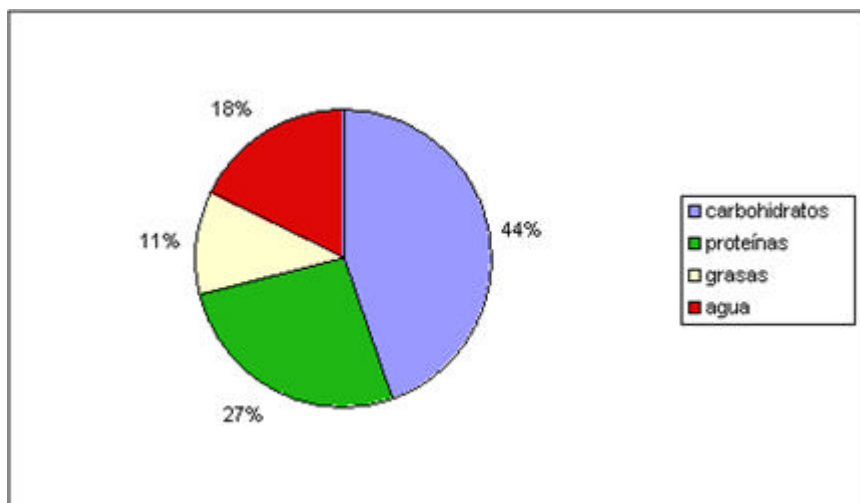


Figura 8. Composición porcentual de un alimento (datos cuadro 1)

Estas columnas tridimensionales no le otorgan mayor claridad a la lectura de los resultados.

Ejemplo 3.

Se dispone de un medicamento que elimina manchas de la piel y se desea conocer si su efecto depende del sexo de la persona (mujeres versus hombres) y se estudian los casos a las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación. El número de individuos voluntarios de cada muestra es idéntico. Si se asume que los resultados obtenidos son los del cuadro 3 ¿cómo resultará la representación?

Cuadro 3. Desaparición de las manchas en función del tiempo en hombres y mujeres tratados.

grupo	24 h	48 h	72 h
mujeres	30*	40	60
hombres	15	20	30

* expresado en %.

Los resultados se presentan en la figura 9, la variable X se presenta en forma de intervalos correspondientes a los días de lectura. El valor de Y es numérico.

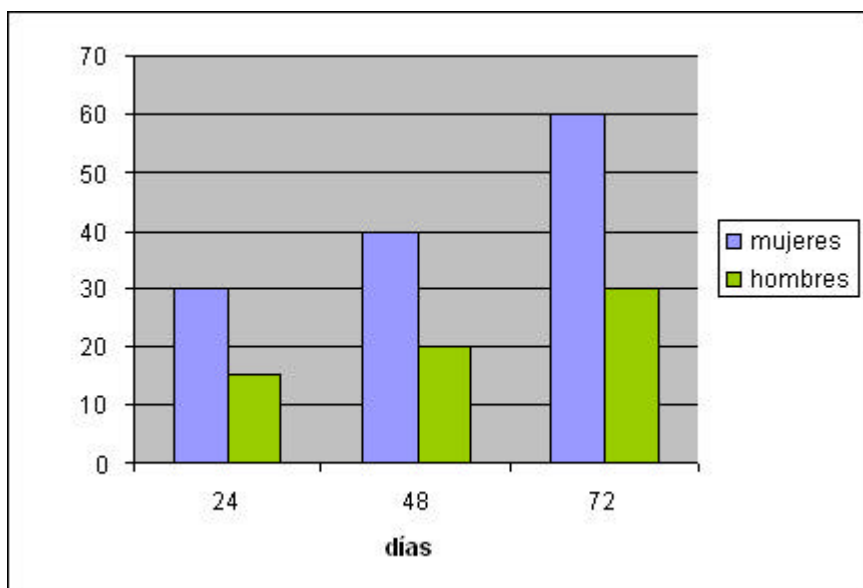


Figura 9. Respuesta al tratamiento para quitar manchas de la piel en hombre y mujeres.

El conjunto de números del eje Y se denomina **escala**, en este caso el cero corresponde al punto de intersección de ambos ejes. La escala tiene un valor máximo de 70 y los intervalos de la escala valen 10 unidades.

Una lectura de este gráfico muestra en forma inmediata que el medicamento fue más efectivo en las mujeres que en los hombres y que no protege a todos los tratados siendo el máximo de efectividad del 60% en las mujeres y el 30% entre los hombres, es decir, que tiene una eficacia igual al doble entre las mujeres respecto de los hombres. Además se puede deducir que su efecto aumenta con el tiempo que transcurre desde su aplicación y además que por lo menos hay que esperar 72 horas para que haya efecto. También podríamos sacar otras conclusiones. **¿Se animan?**

Hay tres tipos de gráficos para representar datos de series que dependen del tiempo, éstos son:

- gráficos de barras horizontales
- gráficos de barras verticales
- gráficos de líneas

El gráfico 10 se construyó con los mismos datos salvo que las barras son horizontales y la figura 11 muestra los mismos resultados pero con líneas.

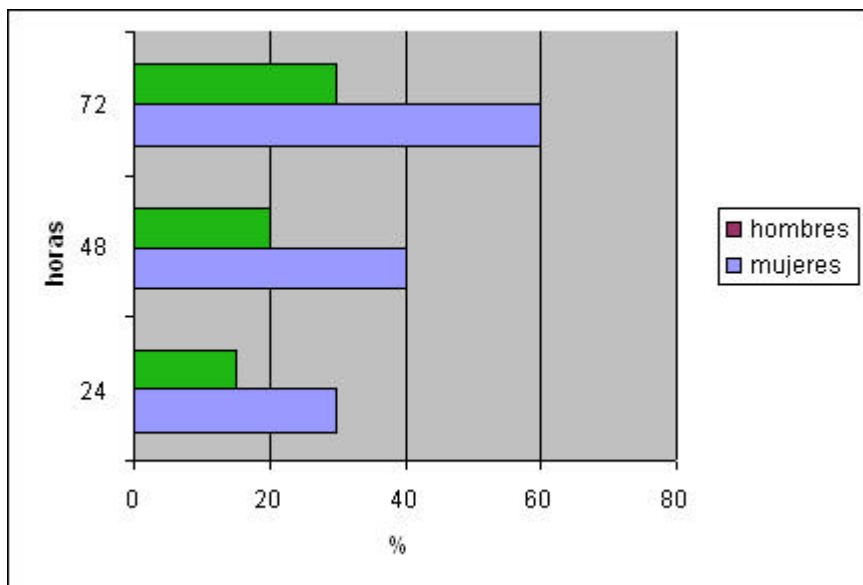


Figura 10.

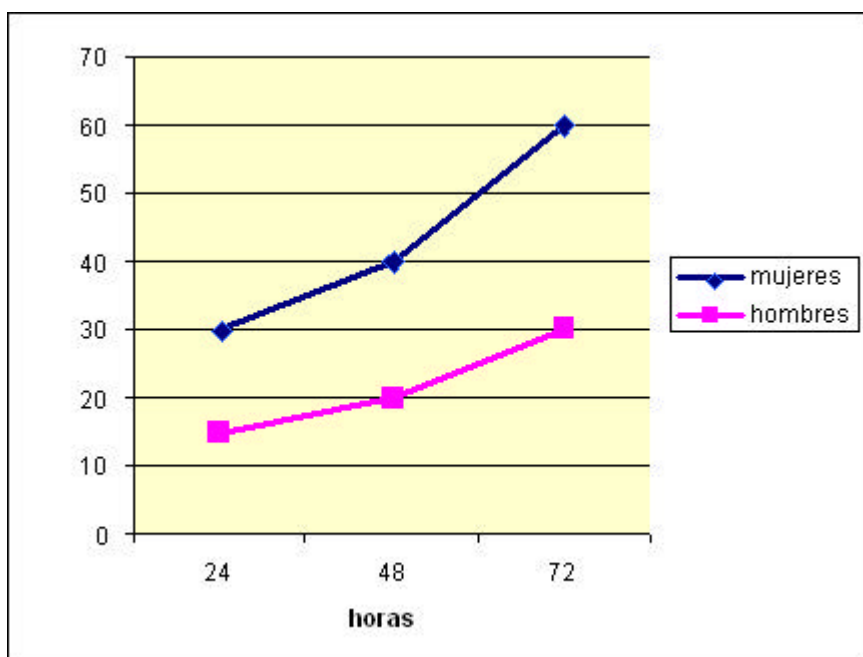


Figura 11.

La conclusión sobre cuál es la forma más rápida y mejor de representar los resultados se los dejo a ustedes lectores de este capítulo.

Gráficos tipo curvas

Supongamos que realizamos un experimento con ratones en los que queremos probar si la administración de tres drogas diferentes puede evitar la mortalidad de los animales infectados con un virus. Para realizar el experimento dividimos los ratones de igual peso y sexo en cuatro grupos (por ejemplo de 10 animales cada grupo). El grupo control estará formado por ratones infectados sin tratar. El grupo 1 con ratones infectados y tratados con la droga 1, el grupo 2 de tratados serán infectados y tratados con la droga 2, el grupo 3 ídem pero con la droga 3. Todos los días se observarán los animales y se registrará el número de muertos en cada grupo por un período de 7 días al cabo del cual se dará por terminado el experimento. Los resultados se volcaron en el cuadro 4.

Cuadro 4. Mortalidad de ratones infectados con un virus y tratados o no con drogas.

Días post-infección	Grupo control *	Grupo tratado con droga 1	Grupo tratado con droga 2	Grupo tratado con droga 3
1	0	0	0	0
2	10	0	20	10
3	25	10	30	20
4	40	20	50	30
5	80	40	90	40
6	100	60	100	40
7	100	70	100	40

* Los datos se expresan en mortalidad acumulada % es decir, a medida que transcurren los días, se suman los números de muertos y se calcula el %. Los valores oscilarán entre 0 y 100.

La representación gráfica de estos resultados se ve en la figura 12.

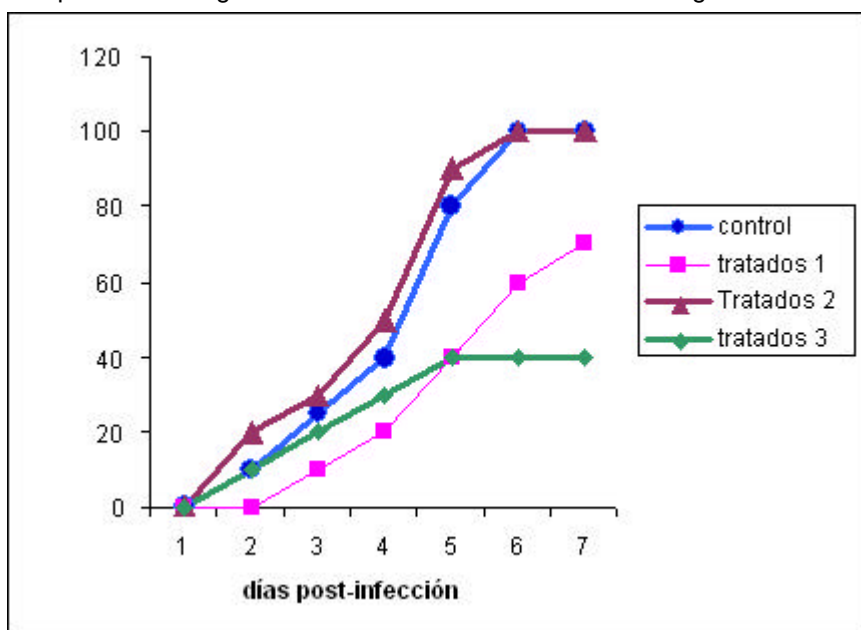


Figura 12. Mortalidad comparada de grupos de ratones tratados o no.

Inmediatamente se deducen las siguientes conclusiones: la droga 2 es tóxica, los animales mueren más rápido que los controles; la droga 1 protege al 20% de los animales como se ve al día 7 en que sobrevive el 20%. La droga 3 es mejor aún ya que protege al 60% de los animales. Veamos qué pasa si se representan estos datos en forma de barras, el gráfico corresponde a la figura 13.

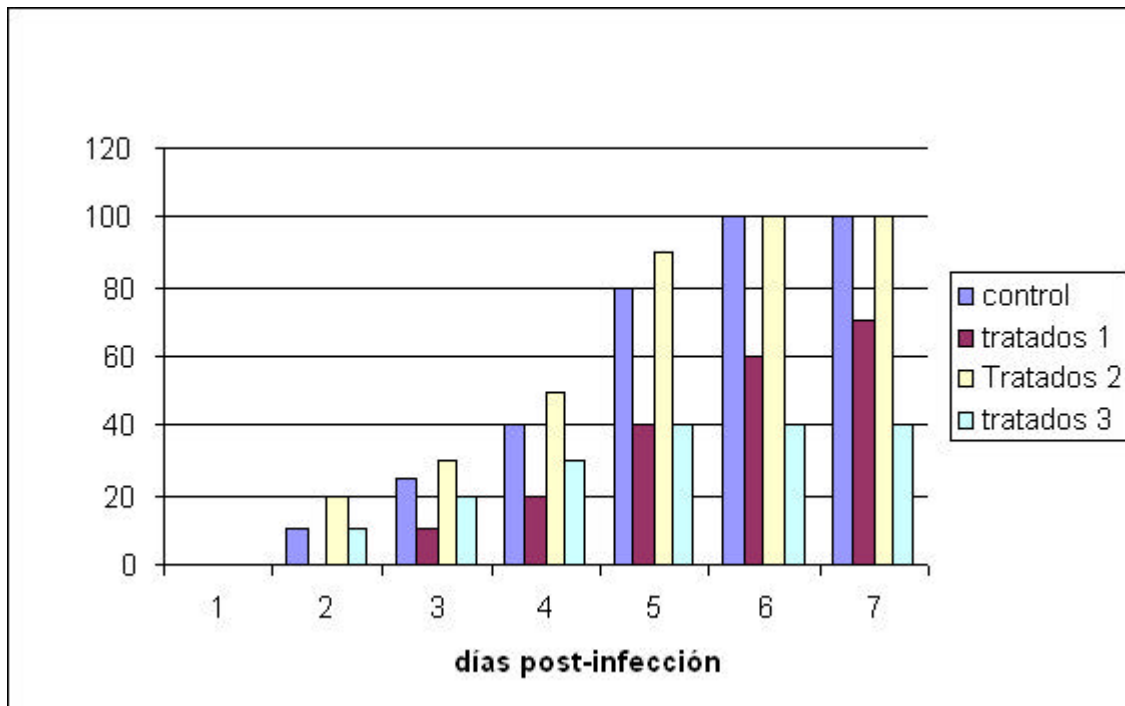


Figura 13. Mortalidad comparada de grupos de ratones tratados o no.

Invitamos a nuestros lectores a sacar conclusiones de las dos formas de representar. Finalmente nos vamos a referir a la elección de la escala apropiada. Para esto nos servirá construir una curva de crecimiento de un virus, tenemos que suponer que de alguna manera podemos calcular el número de partículas virales que hay en el medio de cultivo. Cuando un cultivo de células se infecta con un virus, las células son necesarias porque los virus son parásitos, a medida que transcurren los días los virus se van multiplicando hasta que al destruir todas las células del cultivo comienzan a morir por efecto de la temperatura ya que son inestables a 37°C. El cuadro 5 muestra datos imaginados con números crecientes tomando como base las potencias de 10 (de 10^2 a 10^6).

Cuadro 5. Curva de crecimiento viral

Días post-infección	Título de virus (número de partículas)
1	----
2	100
3	1000
4	10.000
5	100.000
6	1.000.000

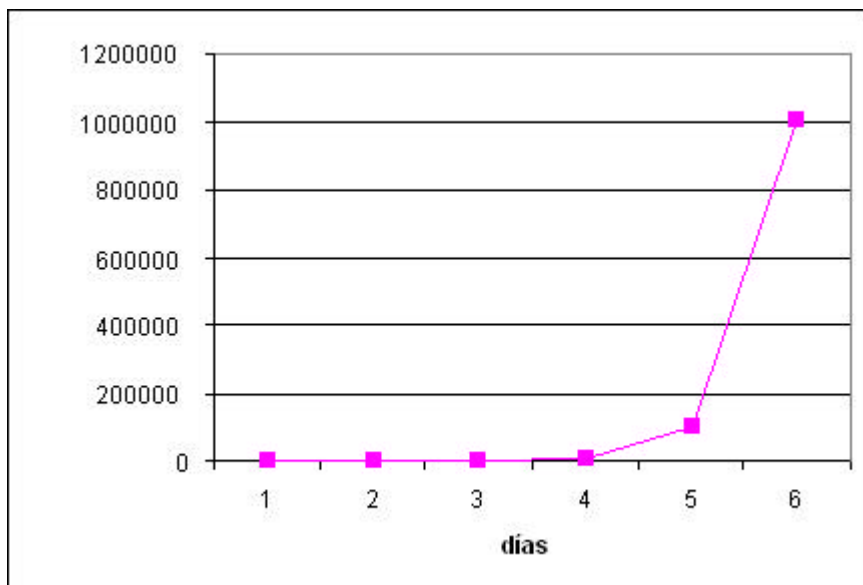


Figura 14. Curva de multiplicación viral

Los datos del cuadro 5 se volcaron en la curva de la figura 14. Como se puede observar la escala del eje Y es una escala decimal y como los números son tan grandes los datos de los primeros días quedan pegados ala eje de las X. Esta representación es incorrecta, cuando se trabaja con números tan grandes la escala de la ordenada debe ser logarítmica (figura 15), al realizar esta transformación el gráfico se convierte inmediatamente en una recta que muestra el crecimiento lineal del virus en función del tiempo de incubación.

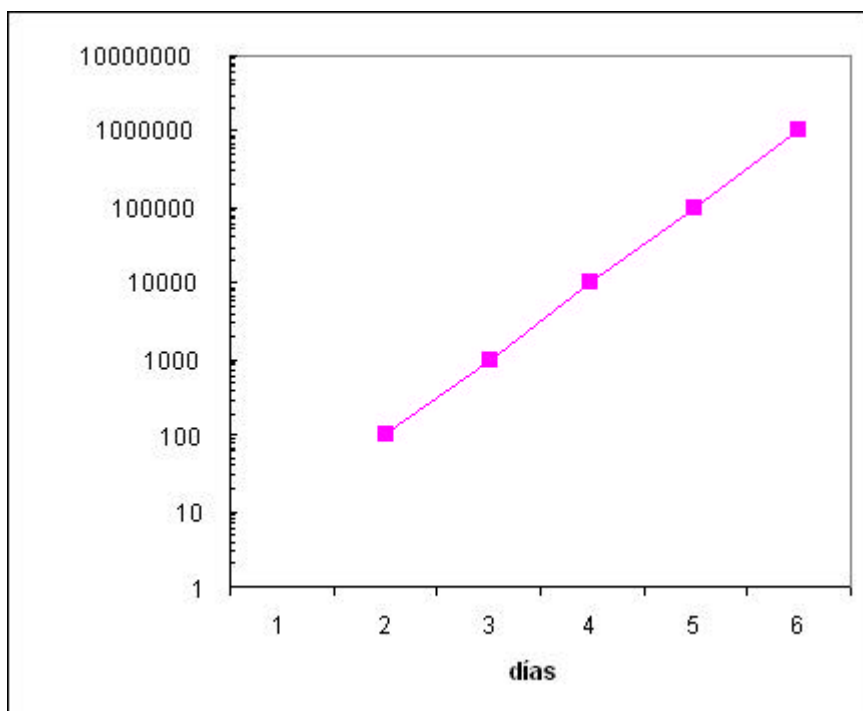


Figura 15. Curva de multiplicación viral

Conclusiones

Existen muchas otras posibilidades gráficas para expresar los resultados de los experimentos provenientes del área de la química o de la biología u otras ramas de las ciencias médicas. No las hemos analizado todas el objetivo de este capítulo ha sido despertar el interés en la graficación de los resultados que obviamente se pueden y deben tabular de modo de lograr una mejor comprensión de lo que esos resultados nos indican.

Bibliografía:

Recomiendo un sitio de Internet de Canadá <http://www.statcan.ca/start.html> donde encontrarán además de explicaciones para cada tipo de representación, un glosario completo de términos necesarios relacionados con la estadística.

Capítulo 12. La comunicación científica escrita

Introducción.

Los resultados obtenidos en una investigación pueden presentarse en forma oral, mediante la ayuda de gráficos y cuadros, según vimos en el capítulo 11. Pero, la mayoría de las veces, hay que volcarlos a la forma escrita. Los modelos de escritura son varios de acuerdo con el tipo de resultados que se quieran publicar, pero en términos generales se pueden ubicar dentro de cinco categorías:

- Trabajos originales de investigación (papers)
- Monografías
- Tesinas
- Tesis
- Revisiones o puestas al día de un tema

Ya sea que la ponencia escrita sea en inglés o en español es fundamental tener dominio de la escritura, en especial de la sintaxis y los tiempos de verbos a usar. La calidad de un trabajo aumenta notablemente cuanto más simple y claramente se expongan los resultados y estos requerimientos no afectan solamente a las figuras y cuadros, también se aplican al texto.

Trabajos originales de investigación (papers).

Este tipo de trabajos es la moneda corriente de intercambio entre los científicos, pues es la forma en la que éstos dan a conocer sus hallazgos al resto de la comunidad. Existen revistas especializadas de todas las ramas de la ciencia que publican papers en forma impresa, a las que se les han agregado, en los últimos tiempos, las publicaciones electrónicas. Según la disciplina que trate la publicación, se siguen distintas normas para la escritura que son pautadas por el Comité editorial de la revista. Muchas de las publicaciones son el resultado de la actividad científica de una sociedad de científicos dedicados a una rama de la ciencia en particular. Pero la mayoría de las revistas son publicadas por una editorial especializada. En los últimos años se ha dado el fenómeno de fusión entre editoriales con el surgimiento de casi una sola gran editorial, al menos, es lo que ocurre dentro del campo de las ciencias naturales y de la salud humana y animal. Generalmente, en el primer número del año o en el último aparecen en detalle las instrucciones de cómo redactar y distribuir la información, a la vez que se dan precisas instrucciones para su envío. Lo más común es que una revista publique trabajos de investigación originales y trabajos originales breves, también suelen incluir revisiones breves.

Los resultados obtenidos que constituyan un nuevo aporte o un avance a un tema específico de investigación, ya sea de carácter general (que afecte muchos conceptos y se constituya en una nueva teoría) o particular (que agregue un eslabón más en la cadena de conocimientos) es lo que se conoce como paper. Si los aportes del trabajo no son tan completos pero tienen importancia por su novedad pueden constituir lo que se conoce como trabajo original breve. Cada revista tiene sus requerimientos particulares, pero la mayoría solicita que un paper posea las siguientes partes:

Título: el número de palabras que conforman un título está acotado, pero como guía podemos decir que el título debe reflejar el contenido principal del trabajo, es el resumen del resumen del trabajo.

Autores: Nombres y apellidos en el orden que refleje la participación en el trabajo; se asume que el primer autor es aquel sobre el que descansa la mayor cantidad de trabajo, el que puso en marcha las ideas y utilizó las manos. El último autor casi siempre es el jefe del grupo que marca el tema y contribuye con la escritura y consigue los subsidios. Los autores intermedios, que pueden ser 4, 5 o más, son colaboradores. De todos modos, a veces a los dos primeros autores se les atribuye la misma responsabilidad, esto se aclara con una llamada explicativa. En otros casos, cuando el trabajo es el resultado de la interacción de grupos interdisciplinarios, se suele adoptar el sistema de firmar siguiendo un orden alfabético.

Por debajo de los autores figura el lugar de trabajo donde se realizó la investigación, a cuál de los autores se dirigen las consultas y la dirección de e-mail de cada uno o del autor principal.

Resumen: El resumen debe permitir tener una idea de la importancia del trabajo; en general contiene el estado de situación del tema, el o los objetivos, algo de la metodología, los resultados y una conclusión. La extensión depende del número de palabras permitidas por los editores. El resumen se escribe en el idioma usado para escribir el resto del trabajo y si el idioma no es el inglés, por ejemplo, español, se escribe también un resumen en inglés de modo que pueda ser entendido por toda la comunidad científica. Cuando esto ocurre, se le agrega al resumen el título del trabajo en inglés.

Palabras clave: Son palabras o frases cortas que condensan los conceptos principales del trabajo. Son necesarias para la difusión e indexación del trabajo y facilitan la búsqueda bibliográfica. Suele aceptarse un máximo de cinco palabras..

Introducción: Se describen los antecedentes del tema, los hallazgos más notables, la importancia del mismo y qué aspecto debería investigarse. Además, cuál va a ser su abordaje y, muchas veces, en la última oración se comentan los resultados obtenidos.

Materiales y métodos: En este espacio se consignan los elementos usados para realizar el trabajo: drogas, cultivos, microorganismos, especies de plantas etc. Los métodos aplicados, si fueron diseñados para la realización del trabajo, se describen en detalle de modo que cualquier otro investigador pueda reproducir el experimento. Si son métodos ya publicados, se hace una referencia breve y se cita el trabajo correspondiente de donde fue reproducido. Si a ese método se le hubieran hecho modificaciones, hay que mencionarlas.

Resultados: Los resultados deben escribirse en forma clara, ordenada y concisa. La base de los resultados es la presentación de los datos en figuras, fotografías y cuadros. Por eso no es necesario alargar el texto, lo que sí hay que hacer es explicar el porqué y el cómo del experimento sin entrar en detalles técnicos ya que

generalmente al pie de los gráficos y de los cuadros se aclaran. Esto es debido a la exigencia de que los cuadros y figuras deben ser entendibles por sí mismos. En resultados se permiten sacar conclusiones breves que justifican la realización del siguiente experimento y así sucesivamente. A veces según el tipo de datos se los comentan pero no se muestran y figuran como datos no mostrados. A veces los resultados terminan con una oración afirmativa de lo hallado.

Discusión: La discusión suele comenzar con una frase que resume los hallazgos realizados y su importancia. A continuación es necesario realizar un análisis crítico de los resultados, los que se defienden si la estadística aplicada confirma con seguridad los resultados. También es necesario comparar con lo publicado por otros grupos de trabajo, ya sea que respalden los resultados o los contradigan. La discusión es la parte del trabajo que más cuesta escribir a los investigadores con poca experiencia.

Bibliografía: La bibliografía o referencias consiste en la citas ya publicadas por el autor u otros investigadores que fueron utilizadas ya sea que se trate de investigaciones precedentes, o de temas similares que sirven de apoyo a la discusión o trabajos donde aparecen los métodos utilizados en el trabajo. La forma de citación de estos trabajos sigue convenciones internacionales que varían ligeramente según la publicación. La bibliografía se va mencionando a lo largo del texto ya sea en forma numérica o con los nombres de los autores y el año de publicación.

Agradecimientos: este espacio se reserva para agradecer a una o más instituciones el otorgamiento de subsidios y también se mencionan las personas que tuvieron algo que ver con el trabajo, por ejemplo técnicos, secretarías o las personas que hayan realizado una lectura crítica del manuscrito.

Trabajos originales breves: este tipo de trabajos no suele dividirse en las secciones prototípicas que se mencionaron arriba. Por lo general, los materiales y métodos se describen junto con los resultados. De modo que a la Introducción sigue Resultados y Discusión y por último Bibliografía. El número de cuadros y figuras es reducido.

No es fácil escribir un trabajo original, pero la ventaja es que hay muchos modelos a los que se puede imitar, el número de publicaciones es tan grande que seguramente encontraremos el diseño más apropiado para volcar los resultados de nuestro trabajo.

Revisiones o actualizaciones.

Las revisiones suelen escribirse por invitación de algún editor a cargo de series de revisiones. La persona invitada tiene antecedentes de investigación en el tema solicitado. También hay revisiones que el investigador puede enviar por su cuenta. Entre las revisiones se distinguen dos tipos: unas, muy completas con una bibliografía extensa, y otras, que constituyen una actualización de mucho valor de consulta, solo consignan los últimos adelantos, así por ejemplo, pueden citar trabajos no publicados aún.

En cuanto al formato de una revisión, no incluye la sección de materiales y métodos. Comienzan con una introducción histórica hasta llegar al presente y luego se van citando los resultados que se consideran convenientes para la revisión. Es decir, si se trata de temas muy generales, puede haber diferentes aspectos para destacar. Entonces una revisión puede poner el énfasis en un aspecto, mientras que otra aborda el tema desde otro punto de vista. Las revisiones son muy útiles porque incluyen mucha bibliografía, pero su lectura suele ser similar a la de un libro de texto. En forma personal reconozco que las revisiones breves son las más útiles, generalmente aparecen en inglés en las revistas en cuyo título figura la palabra Current o Trends.

Dado que este capítulo pertenece a un curso de Introducción a la investigación, es difícil que nuestro lector emprenda la tarea de escribir un paper o una revisión en sus primeros pasos, pero seguramente deberá enfrentarse a la escritura de una monografía o de una tesina.

Monografía: Es un trabajo de descripción de una tema en particular. Su longitud queda pautada por quien o quienes la solicitan. El autor no tiene necesidad de incluir datos de su autoría ni tiene que saber el tema a la perfección. En una monografía se vuelcan los datos más relevantes que hay sobre el tema elegido, debe ser concisa y es generalmente aplicada a un tema puntual. Las monografías dentro del ámbito de la Universidad se solicitan para aprobar algunos trabajos prácticos. El uso de la computadora y la información que circula por Internet, siempre que sea confiable, facilitan notablemente la escritura de una monografía. Así es como el famoso cut and paste es un recurso muy utilizado. Sin embargo, el uso de cut and paste debe ser cuidadoso. Lo primero que debemos hacer es no tentarnos con copiar lo existente, es seguro que nos resolverá el problema, pero, en primer lugar, no es ético y, en segundo lugar, no contribuye en nada a la propia formación científica. Toda aquella información que se adquiere sin pensar, nos abandona fácilmente. Escribir una monografía significa poner las ideas en orden, así la secuencia de oraciones producto de nuestro pensamiento será fácil de entender. Para ello, después de estudiar sobre el tema, tendremos que saber distinguir entre los aspectos más relevantes, aquellos no pueden dejar de mencionarse y los colaterales que son aquellos que pueden ser eliminados sin alterar los conocimientos que queremos transmitir. Es útil armar un esquema con subtítulos que serán colocados en orden de importancia y luego tratar de completar la información que anuncia cada subtítulo. De esta manera terminaremos de armar un informe o monografía aceptable. Al final se deberán citar las fuentes consultadas.

Tesinas o tesis de Licenciatura: Es cada vez más frecuente que en las carreras biológicas los alumnos opten por la realización de una tesina en lugar de cursar una materia. Redactar una tesina tiene muchas ventajas, y una sola desventaja: consume más tiempo que una materia regular. Desde el punto de vista de la formación de un profesional, es muy adecuado realizar una tesina porque es la iniciación en la investigación. Las carreras de carácter experimental incluyen además de los estudios teóricos una parte práctica, pero no siempre los prácticos se llevan a cabo en forma individual. Por otra parte se hacen bajo la guía de los docentes además de disponer casi siempre de una guía detallada de los pasos a seguir. Cuando se ejecuta una tesina, se trabaja en forma individual y hay que enfrentar la correcta preparación de los reactivos o de

las muestras o del material en estudio. También es la forma de acercarse a un investigador formado que propone un tema, aunque generalmente la supervisión del trabajo de la tesina queda en manos de investigadores más jóvenes. No son de extrañar, entonces, los largos y emotivos agradecimientos a todos los integrantes de un laboratorio que aparecen en las primeras páginas de la presentación escrita de la tesina.

¿Cómo se presenta una tesina? Además de la presentación oral, se escriben los resultados siguiendo algunos esquemas aceptados. Uno de los más comunes es subdividir el trabajo en los siguientes ítems:

- Introducción
- Objeto (Propósito del estudio)
- Materiales y métodos
- Resultados
- Discusión
- Bibliografía

Cuando se escribe una tesina, hay que tener en consideración que no se trata de un trabajo de tesis, por eso, aunque las divisiones del trabajo son coincidentes con las de muchas tesis, la extensión de cada apartado es mucho más reducida. Y eso reside en el hecho de que el número de experimentos requeridos es mucho menor. El propósito docente de que un alumno realice una tesina es iniciar al alumno en el mundo de la investigación, y estimular sus cualidades intelectuales así como la habilidad para resolver problemas.

En cuanto a la escritura en sí, conviene consultar la bibliografía precedente acerca del tema y, sobre todo, inspirarse en otras tesinas presentadas por el grupo de investigación. Para escribir bien hay que entender bien y, de ese modo, poder presentar los resultados obtenidos en términos concisos y precisos. A diferencia de una monografía, en una tesina se debe enfatizar el apartado de materiales y métodos, ya que muchas veces un desafío que se le plantea al alumno es el mejoramiento de un método de trabajo o la implementación de alguna técnica que no se use de rutina en el laboratorio elegido. La Discusión no tiene tanto peso como en un artículo original ni en una tesis.

Respecto de la escritura, es recomendable no utilizar la jerga del laboratorio, el uso excesivo de abreviaturas obliga una y otra vez a consultar su significado. Nuestro idioma español es muy rico y permite la realización de una escritura clara, por supuesto si se domina la sintaxis. Es muy común en las ciencias experimentales el uso de galicismos, pero más frecuente aún es la excesiva utilización de anglicismos. Muchas palabras inglesas de uso común en la ciencia han sido adoptadas por el español, a veces con algún cambio de ortografía, pero otras se aceptan como son en inglés. El abuso de los términos extranjeros no debe considerarse un mérito, ya hay mucha gente que habla y lee en inglés, más bien demuestra el poco esfuerzo que se hace para expresarse correctamente.

Tesis de doctorado: Dado el carácter introductorio de este curso, es prematuro y fuera de tiempo dedicar mucho espacio a cómo se escribe una tesis. Ésta es una obra mayor que transmite los resultados de una investigación, producto del esfuerzo de tres o cuatro años de trabajo. En consecuencia, se requiere bastante

tiempo para poner sobre el papel la tarea realizada. Hay distintas formas de presentar una tesis, que esencialmente no difieren en los contenidos. Pero todas las tesis de carácter experimental están divididas en:

- Introducción
- Resumen
- Abstract
- Objetivo u objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados
- Discusión
- Bibliografía o referencias

Constan además de una carátula cuyo contenido lo fija la respectiva Facultad pero que casi siempre consiste en el título, nombre del autor, nombre del director, lugar de trabajo y fecha de presentación, así como una frase que dice: Trabajo de tesis presentado para optar al título de Doctor... Le sigue a la carátula la página de las dedicatorias y agradecimientos.

La escritura de una tesis puede demandar seis meses o más, por lo que resulta recomendable solicitar permiso para dedicarse a escribir la tesis en forma exclusiva. Siempre se hacen dos o tres borradores hasta que el director acepta la presentación pero entre los directores hay toda una gama de personas con sus propios intereses y peculiaridades que no es necesario analizar aquí. La tesis es un documento muy importante en la carrera de un universitario que servirá de modelo a otras tesis, de ahí el empeño en una buena presentación escrita. Parte del contenido de la tesis puede ser publicado antes de su defensa.

Una última recomendación: el lenguaje de la ciencia tiene su terminología propia, pero lo principal es saber escribir en español; la consulta con un buen diccionario (por ejemplo el de la Real Academia Española, el buen uso de los gerundios, los tiempos de verbos y la consulta a un diccionario de sinónimos es indispensable porque, si bien el corrector del Word detecta faltas de ortografía, no puede, por ahora, suplantar el fluir de la pluma.

Capítulo 13

Herramientas moleculares: Biotecnología

Parte 1.



Introducción.

Sin dudas se puede considerar al descubrimiento de la estructura de la molécula del ADN (ácido desoxirribonucleico) como el hallazgo científico más importante del siglo XX. Es como si se hubiera terminado de leer un libro sobre la vida lleno de incógnitas y el ADN fuera la clave para escribir otro en que dichas incógnitas son reveladas.

El trabajo publicado por Watson y Crick en abril de 1953 permitió establecer que el DNA era la molécula encargada de portar el código genético y por lo tanto la llave de la herencia y la evolución. El conocimiento de cómo se almacenaba y duplicaba la información genética permitió el estudio de la biología a otro nivel iniciándose la era de la Biología molecular además de recibir sus autores el premio Nobel de Fisiología y Medicina. En 1978 el descubrimiento de las enzimas de restricción mereció también el otorgamiento del mismo premio a Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith ya que su descubrimiento condujo al desarrollo de la tecnología conocida como del ADN recombinante que culminó con una nueva rama del saber conocida como Biotecnología. Así, la primera aplicación práctica de las enzimas endonucleasas de restricción fue la manipulación de la bacteria *E.coli* para producir insulina. Las enzimas de restricción son como tijeras que permiten cortar el ADN en sitios específicos, de esta forma se puede remover un segmento de ADN e insertar en su lugar otro y a la vez ese segmento de ADN puede ser incorporado en otro ADN diferente. Mediante esta tecnología fue y es posible el clonado de un gen de interés, determinar las funciones de los genes, producir proteínas en organismos unicelulares o en células cultivadas *in-vitro* y decenas de aplicaciones más, entre ellas, la obtención de ratones *knock out*.

En el esquema siguiente (1) se muestran todas las líneas de desarrollo derivadas de la Biología molecular y las tecnologías asociadas: el cultivo celular y los anticuerpos monoclonales (ver capítulo 10 de este curso). Mediante la tecnología del ADN (ver rama de la izquierda) es posible resolver un crimen determinando el patrón genético de un acusado o de su víctima y asociarlo con alguna huella hallada en la escena del crimen, por ejemplo un pelo o una mancha de sangre o de semen y se puede terminar la identidad de una persona y su relación con sus padres biológicos. Ha sido posible crear bancos de secuencias de ADN, ARN y proteínas de diferentes organismos. A la vez que fue posible completar el mapa

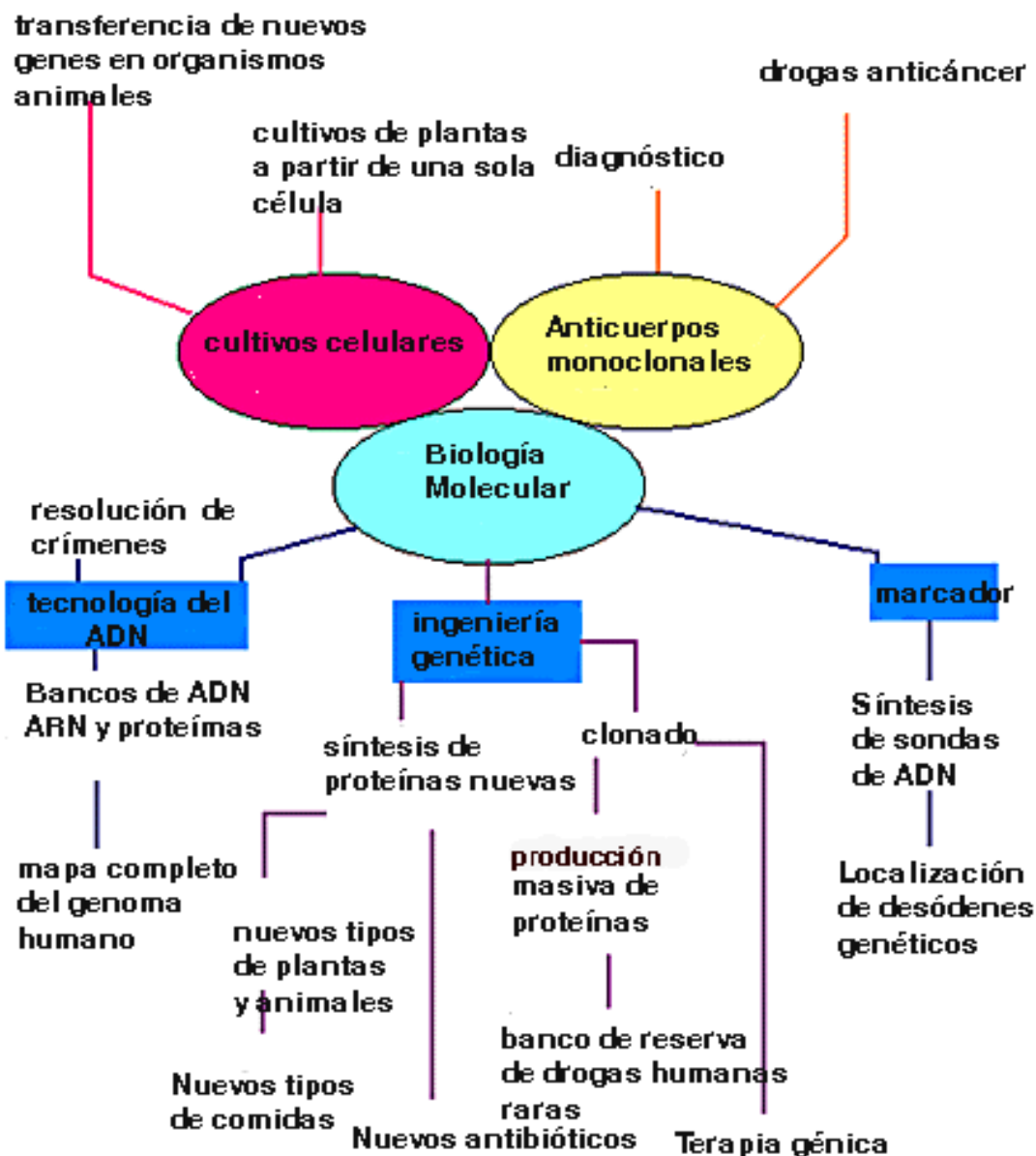
genético del genoma humano, establecer relaciones filogenéticas con otros animales para completar el árbol evolutivo. Así como se conocen también los mapas genéticos, de virus, bacterias y otros microorganismos.

La rama del centro muestra las posibilidades de la ingeniería genética, por un lado es posible sintetizar nuevas clases de proteínas que pueden derivar en nuevos tipos de animales o plantas con los que se producen a su vez nuevos productos alimenticios y también encarar la síntesis de nuevos antibióticos. Mediante ingeniería genética aplicando el proceso denominado clonado molecular se ha podido producir proteínas en masa, utilizando microorganismos o células en cultivo,. Estas proteínas como las hormonas, entre ellas la insulina, por ejemplo, tienen una aplicación importante en medicina.

Datos sobresalientes de la estructura del ADN.

Considerando el carácter básico de este curso vamos a repasar los hechos salientes de la estructura del ADN que permiten su copia fiel dentro de las células y su manipulación fuera de ellas.

Figura 1. Esquema de los alcances del uso de la tecnología del ADN recombinante.¹



¿Cuáles son los componentes básicos de la molécula de ADN? Se trata de un polímero (poli= muchos; mero= partes) o sea es una molécula formada por la repetición de unidades. Cada unidad está constituida por una base (púrica o pirimidínica), una molécula de azúcar (desoxirribosa) y una de ácido fosfórico. La estructura del ADN se representa como se ve en la figura 2 en un solo plano, nótese que la T y la C tienen un solo anillo y pertenecen a la familia de las pirimidinas. La A y la G son purinas. Las cadenas se orientan en distintas direcciones 3' ó 5', se dice que son antiparalelas. Un hebra tiene la dirección 3'-5' y la otra 5'-3' y esto se relaciona, como vamos a ver en la figura 3 con la forma en que se unen a los carbonos del azúcar.

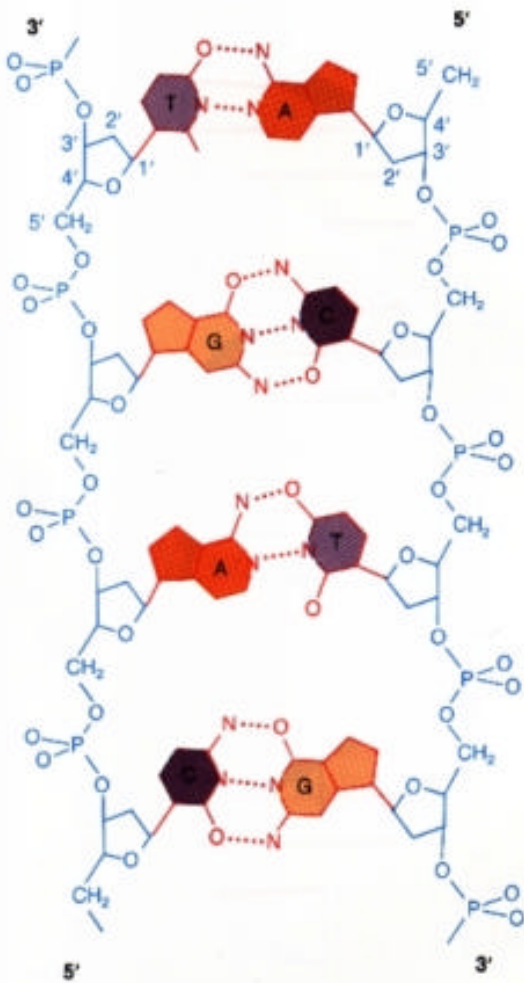


Figura 2 Estructura de una cadena de ADN. Las bases adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) están enfrentadas de a pares AT/TA; GC/CG el orden va cambiando a lo largo de la molécula pero el enfrentamiento de los pares es obligatorio. En la molécula de ARN la T es reemplazada por el uracilo (U). Cada base está unida a un carbono de la desoxirribosa y las ribosomas forman una larga cadena unidas entre sí por ácido fosfórico.

Una representación plana de la ribosa y desoxirribosa se pueden ver en la figura 3.

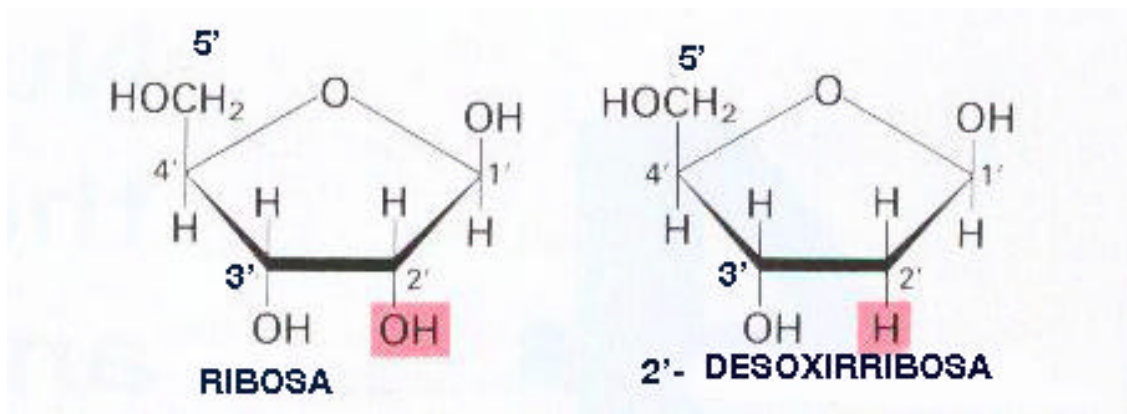


Figura 3. Los azúcares constitutivos del ARN y del ADN respectivamente.

La diferencia entre ambas moléculas de azúcar es que la ribosa ha perdido el OH (oxidrilo u hidroxilo) del C 2' y ha sido reemplazado por un H (hidrógeno). En el dibujo se destacaron los carbonos 3' y 5' que son los carbonos a los que se unen las bases en el ADN o en el ARN. En la molécula de ARN el azúcar que la forma es la ribosa. Si volvemos a mirar la figura 2 entendemos un poco más sobre la estructura de una molécula de ADN. La molécula de ADN está formada por cadenas complementarias que forman una hélice, pero en este dibujo la molécula se muestra sobre el plano con el objeto de visualizar las uniones químicas. El esqueleto externo de ribosa-fosfato se lo dibujó en azul y las bases son de otro color. La G es naranja, la C es negra, la A es roja y la T es violeta. Por convención el ADN se escribe según la dirección 5'-3' la hebra izquierda sería CAGT y la derecha GTCA. En la figura 4 se ilustra la estructura de un ADN tridimensional.

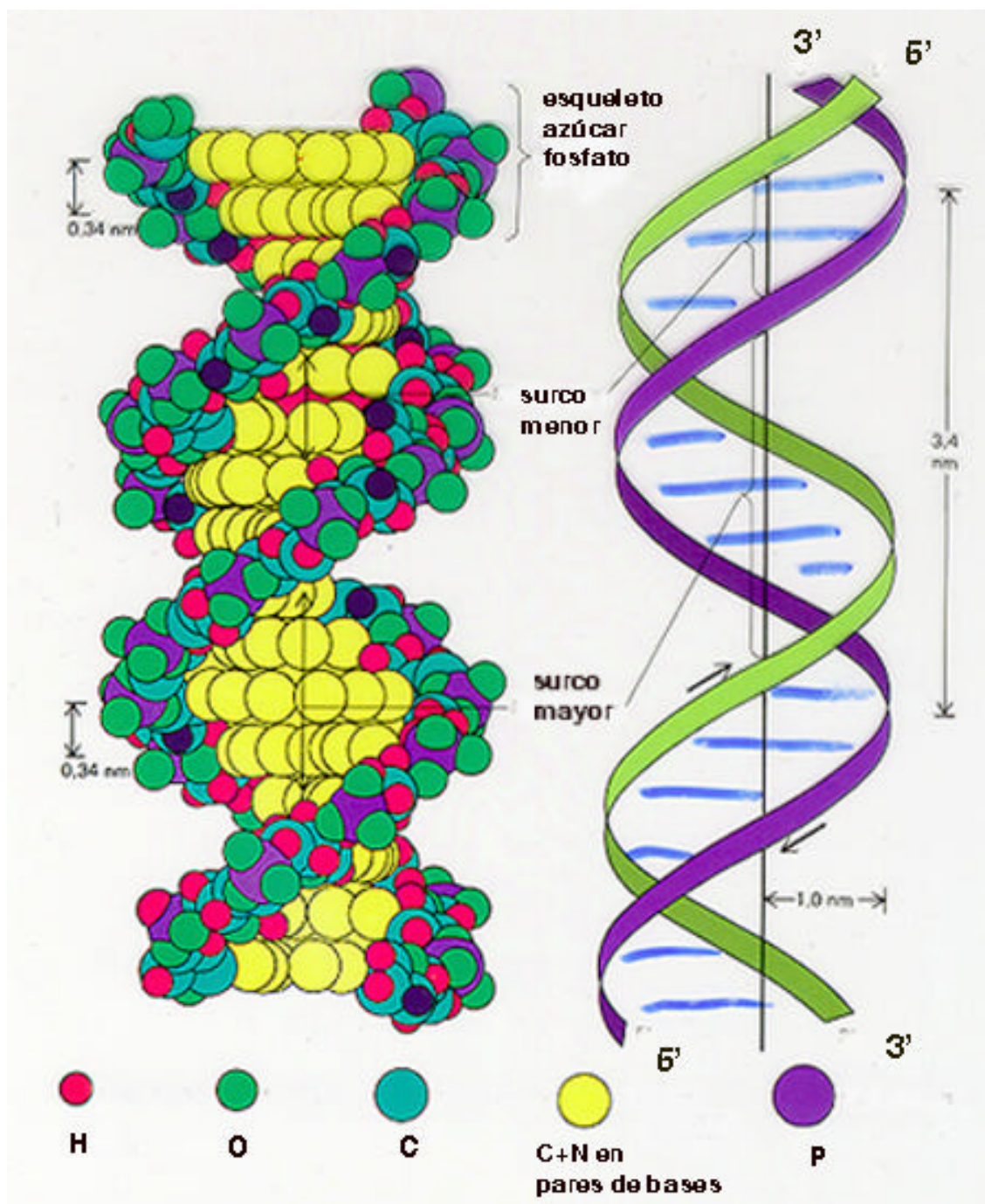


Figura 4. Las bolitas de colores representan los átomos de la molécula, es una representación en 3D. Con rojo se distinguen los átomos de hidrógeno (H); con verde los átomos de oxígeno (O), con verde en círculo más grande son los carbonos (C). Los átomos violeta son los fósforos (P) y los átomos de nitrógeno (N) de las bases se representaron en violeta. En ambas representaciones se muestra claramente que el esqueleto de azúcar fosfato son los “pasamanos” de la escalera de la hélice y la unión entre bases opuestas de ambas cadenas son los “escalones”. La dirección de los pasamanos o cintas se notan perfectamente en el dibujo de la derecha, la hélice va formando un surco menor y un surco mayor. El entrelazamiento de las cadenas se manifiesta claramente así como la direccionalidad a la que nos referimos más arriba. Esta molécula de ADN se comprime tanto que una célula humana puede alojar un metro de ADN comprimido.

La clave de la fidelidad: las uniones hidrógeno

Antes de continuar con los aspectos específicos del tema, pensemos que la molécula de ADN encierra en su diseño una sabiduría exquisita. ¿Porqué? Porque, si no se guarda fidelidad cada vez que la molécula se copia de la hebra original o molde se producirán alteraciones en los patrones de proteínas que esta molécula codifica. No olvidemos que el ADN de una célula encierra la información para fabricar todas las macromoléculas celulares, proteínas y todos los tipos conocidos de ARN. Si bien a veces, por mutación, se produce algún cambio en su secuencia de nucleótidos, estos cambios pueden llevar entre otros problemas graves a la producción de tumores, por eso la molécula tiene un medio para asegurarse de que si en una cadena hay una A en la otra habrá una T o si en una hay una C en la otra encontraremos una G. ¿Cómo se logra esta fidelidad? Aquí intervienen las uniones hidrógeno.

Entre las interacciones entre átomos de distintas moléculas encontramos las uniones hidrógeno, se denominan así porque uno de los átomos involucrados es el hidrógeno, estas uniones son más débiles que las uniones iónicas y las covalentes. En este tipo de uniones el hidrógeno se puede unir al oxígeno, al nitrógeno o al flúor que son todos átomos fuertemente electronegativos (llamados donantes) que atraen la nube de electrones que circunda alrededor del núcleo de hidrógeno y de este modo descentralizando la nube deja al átomo de H con carga parcial positiva. aunque el H es un átomo pequeño respecto a los otros la carga que se genera tiene alta densidad y es capaz de atraer un par de electrones de cualquiera de los átomos mencionados estableciendo la unión hidrógeno. En cierto modo entonces la unión H-H se comporta como una unión covalente. ¿Para qué aprender la unión H? se preguntarán. Es que la fidelidad de la copia del ADN depende de ellas, en la figura 5 se explica este punto.

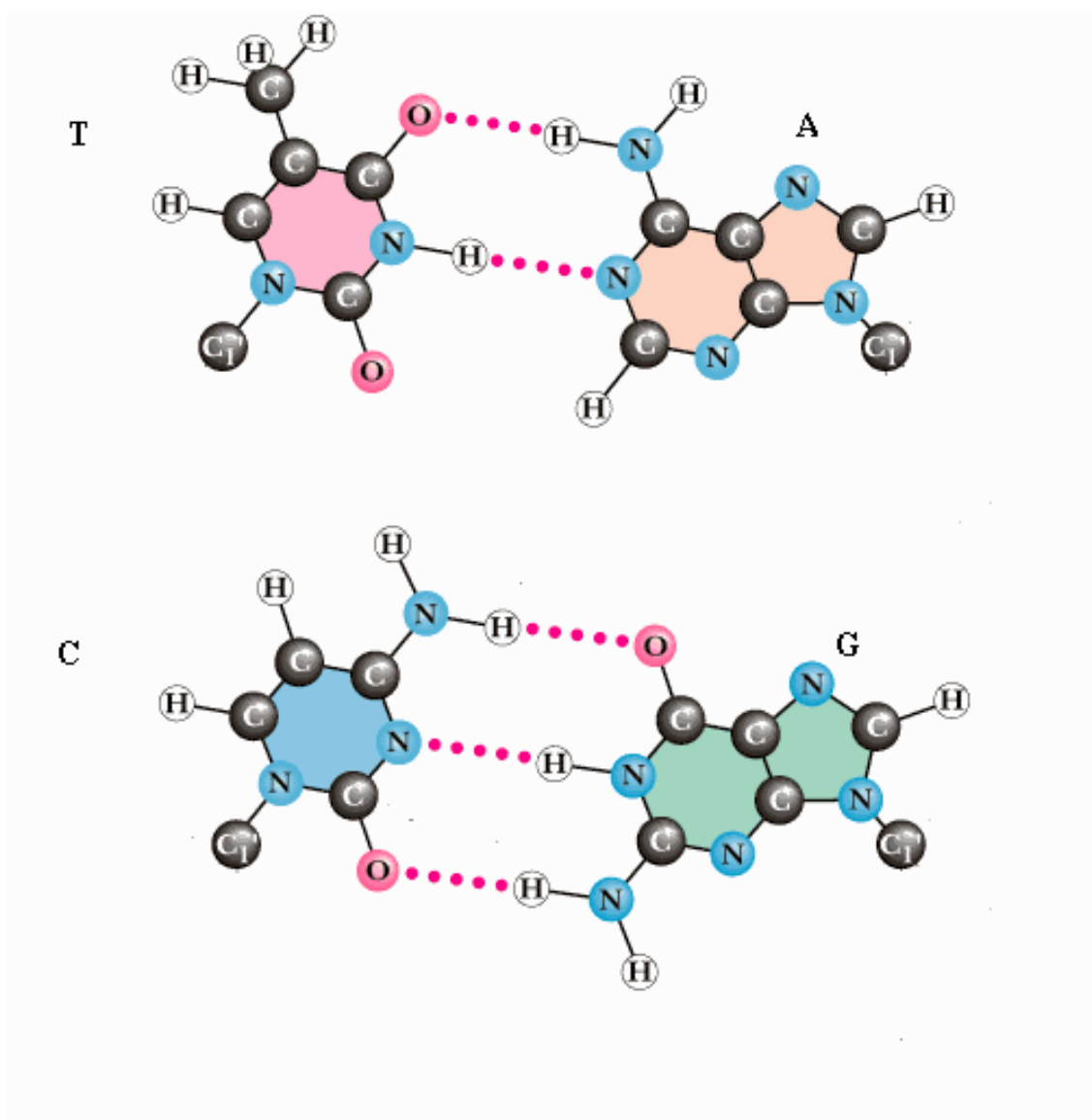


Figura 5. El par T-A comparte dos pares de uniones de hidrógeno y el par C-G comparte tres uniones de H. No hay otros enlaces energéticamente favorables. Salvo el uracilo que al igual que la timina se puede unir a la adenina. Comparar con la figura 2 en la que se señalan los puentes pero donde se han omitido por razones de simplicidad los átomos de H.

Las cadenas se separan naturalmente y por calentamiento.

La molécula de ADN es muy estable pero en algún momento las cadenas se tienen que separar. Cuándo y cómo ocurre esto son dos preguntas que surgen espontáneamente. En los procesos naturales que ocurren dentro de la célula sabemos que el ADN tiene que pasar su información al ARN mensajero (ARNm) para que, interactuando con los ribosomas del citoplasma, se sinteticen las proteínas. Sabemos que el ADN nunca sale del núcleo pero sí lo hace el ARN. Durante las diferentes etapas del ciclo celular las células necesitan proteínas y en otros momentos que preceden a la división celular se necesita que las cadenas se abran para poder hacer nuevas copias de ADN. Esto ocurre a temperatura fisiológica (37° C) pero para los objetivos de este capítulo, brindar información sobre herramientas biológicas, nos interesa saber que las dos

hebras de ADN se pueden desnaturalizar (separar) por calentamiento a 100° C. Nos estamos refiriendo a la situación en que tenemos ADN puro aislado en tubo de ensayo. A esa temperatura alta se rompe la complementariedad de las bases y la hélice colapsa disociándose en dos hebras de cadena simple. Este proceso puede revertir si la solución se deja enfriar lentamente, entonces la doble cadena se restituye, a este proceso se lo denomina de renaturalización o hibridización. El fenómeno de hibridización ocurre entre cadenas ADN/ADN; ADN/ARN; y ARN/ARN. Cuando el ARN compite por ADN y está en exceso se forman los híbridos entre ambos tipos de ácidos nucleicos (ver figura 6). Es bueno saber que si el enfriamiento de la solución es muy brusco las cadenas quedan definitivamente separadas.

Las reacciones de hibridización pueden ser usadas para detectar y caracterizar secuencias nucleotídicas utilizando como buscador a un fragmento de ADN denominado sonda, más adelante explicaremos como se obtiene una sonda.

Enzimas de restricción: tijeras moleculares.

Las enzimas son una clase muy particular de proteínas conocidas como catalizadores que se comportan como una máquina que fabrica envases. Por un lado entra el plástico y, por el otro lado, sale una botella. Al término del proceso la máquina queda invariable pero el sustrato (plástico) se ha convertido en producto (envases). La figura 7 ilustra este punto, una vez que termina la reacción la enzima está lista para iniciar otra. Las enzimas celulares que aseguran la síntesis y la copia (transcripción) del ADN cumplen varias funciones. Las denominadas ADN polimerasas van insertando los nucleótidos trifosfatos de adenina, guanina, citosina o timina de acuerdo con la ley de la complementariedad que le dicta la secuencia de la cadena molde, de modo que luego, a través de los enlaces fosfodiéster que se forman entre las deoxirribosas y los residuos de ácido fosfórico, se van incorporando en forma secuencial para formar la nueva hebra.

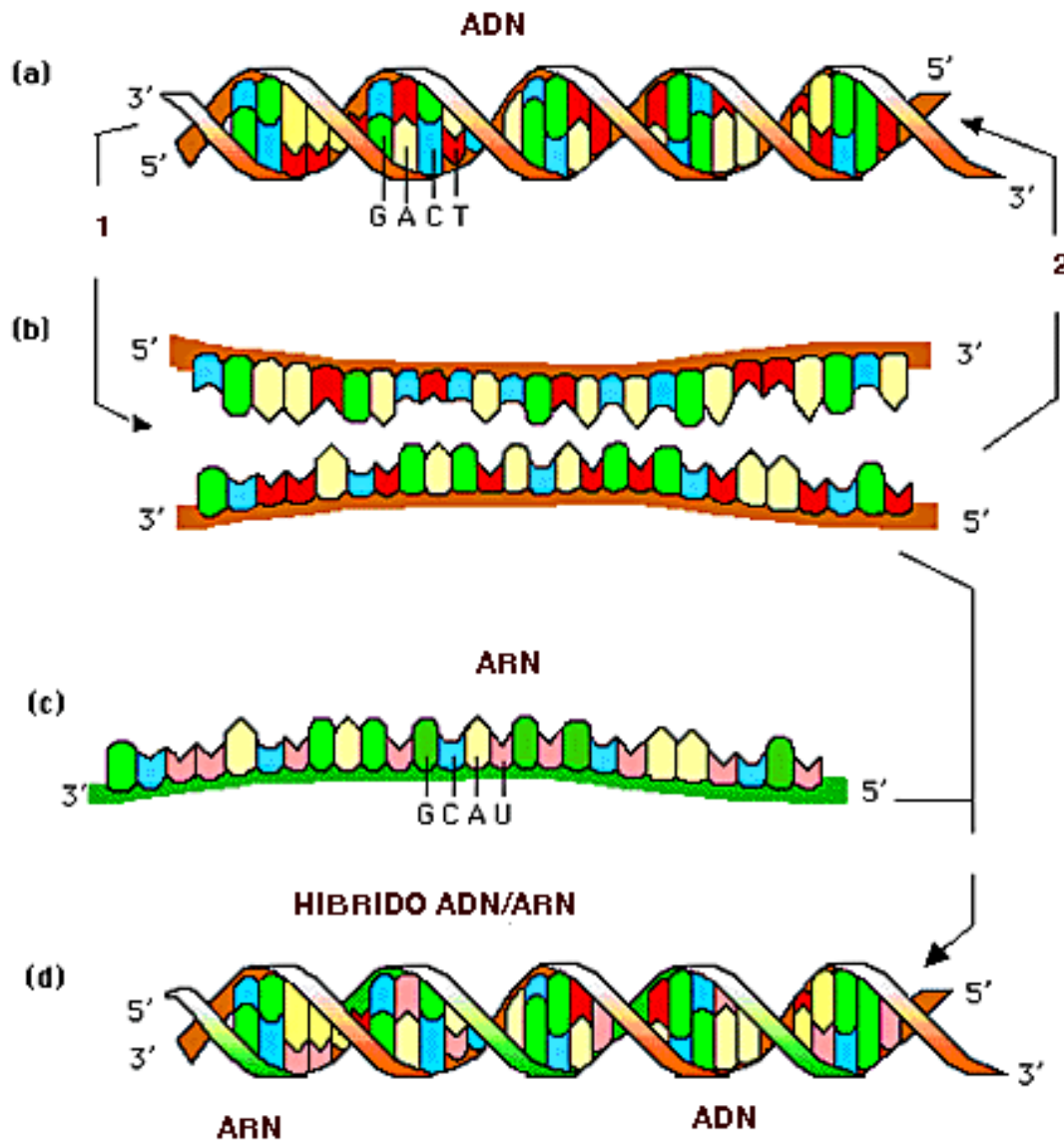


Figura 6. Obtención de un híbrido ADN/ARN. Paso a) el calentamiento separa ambas cadenas de ADN. Paso b) el proceso revierte por enfriamiento y mantenimiento de la solución a 65°C, entonces las cadenas se renaturalizan. Si mientras las cadenas están separadas (b), hay presente un ARN (c) en el paso d) se formó un híbrido mixto.

Hay otras enzimas llamadas endonucleasas que cortan la cadena de ADN, están también las ligasas, que reparan esos cortes, y hay otras, las helicasas que permiten que la hélice se abra de a poco y no como vimos que ocurre en el tubo de ensayo al calentar el ADN. Dentro de las células no hay un proceso tan drástico sino que las dos cadenas se abren por un sector que luego se cierra y así sucesivamente. A veces una misma enzima puede cumplir más de un rol. Pero ya hemos dicho que aquí nos interesa aprender el uso

de las herramientas moleculares y no lo que ocurre en las células. Si alguien desea conocer este tema puede recurrir a los libros de Biología Molecular, hay muy buenos e ilustrativos.

Volviendo a las enzimas de restricción, tenemos que aclarar que son endonucleasas capaz de hacer cortes en la cadena de ADN doble. La enzima hace dos incisiones cada una sobre el esqueleto del azúcar-fosfato sin dañar las bases. Este tipo de enzimas se aisló a partir de bacterias y se denominan de restricción porque fueron aisladas de cepas de la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) habitante del intestino humano. Se denominan de restricción porque estas cepas tenían la característica de restringir (resistir) la infección con bacteriófagos (virus que atacan a las bacterias).

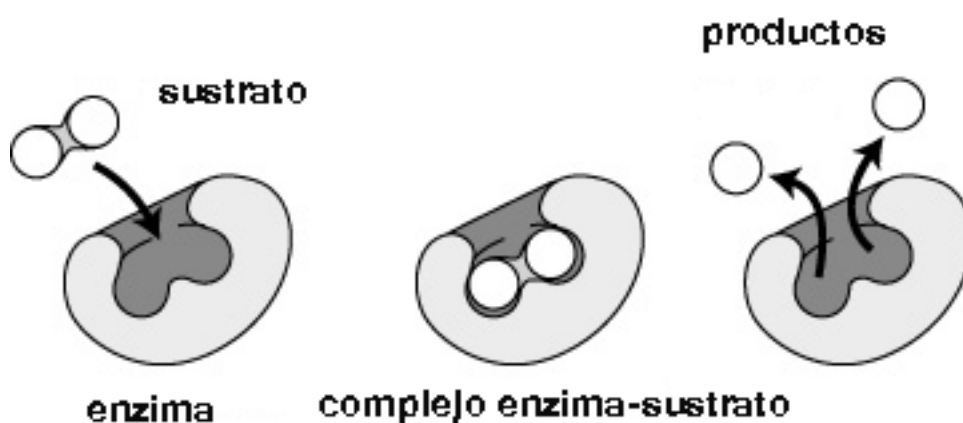


Figura 7. Muestra una enzima con dos sitios de reacción como resultado de la interacción con el sustrato se producen productos nuevos con alta eficiencia.

Las enzimas de restricción son extremadamente útiles porque a diferencia de las endonucleasas celulares que corten el ADN en cualquier sitio, estas enzimas cortan segmentos de la doble cadena en secuencias nucleotídicas particulares y sólo en dichas secuencias conocidas con el nombre de secuencia de reconocimiento. Esto quiere decir, por ejemplo, que si tengo un ADN de una secuencia como la siguiente: ATTCGC TAGGCTA... si la enzima corta la cadena al reconocer una unión GC seguida de TA, en este ejemplo, se producirán dos cortes. Hay ya numerosas enzimas aisladas que cortan en distintos sitios, además según realizan el corte los segmentos de ADN que se forman pueden quedar con los extremos romos o con los extremos pegajosos. Las figuras 8 y 9 muestran ejemplos de lo que estamos explicando.

C C C?G G G
G G G?C C C

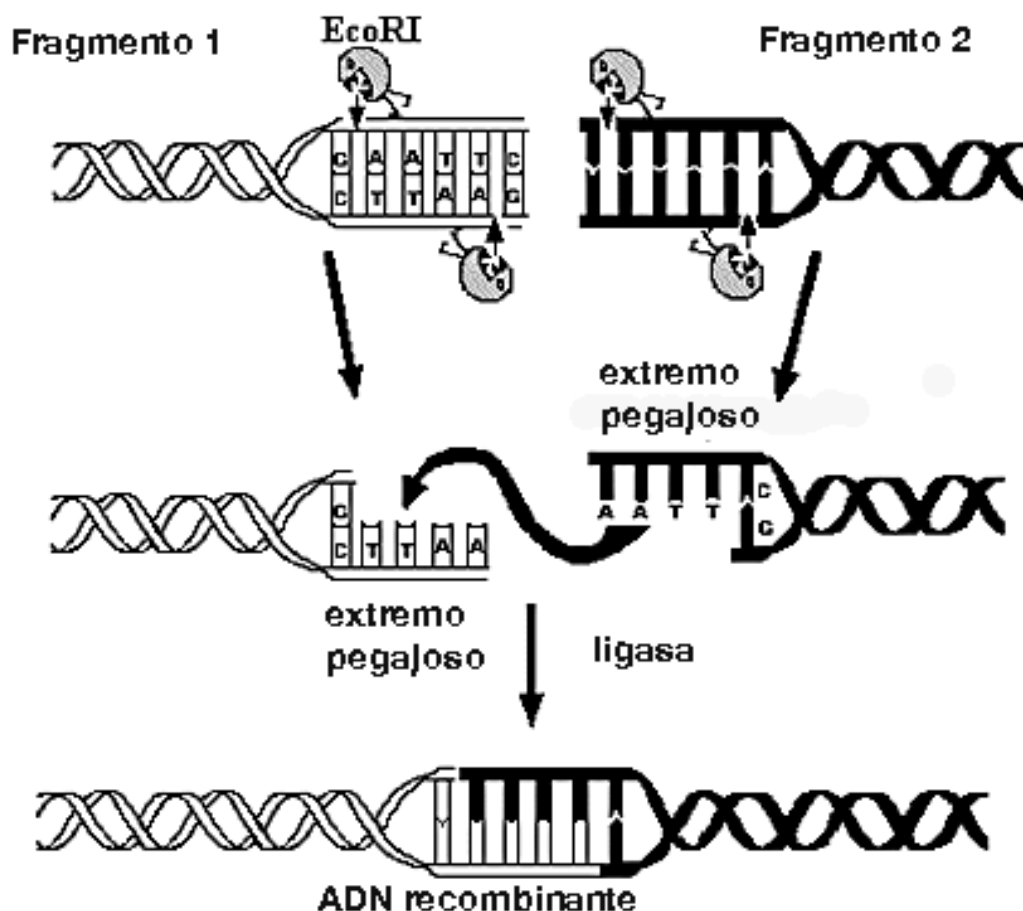
Figura 8: Corte de restricción con la enzima *Sma1* que deja cortes romos.

G?A A T T C
C T T A A?G

Figura 9. Corte realizado por la enzima Eco R1 que deja terminaciones pegajosas.

Debido a que los sitios de reconocimiento sobre el ADN de las diferentes enzimas de restricción difieren, tanto la longitud como la secuencia exacta donde atacará la enzima varían mucho. Hay muchas enzimas de restricción, nosotros sólo mencionaremos unas pocas. La forma de nombrarlas es la siguiente: tomemos como ejemplo: Eco R1 (viene de la bacteria *E.coli* cepa R).

Es posible el apareamiento de las terminaciones de cadena simple con otras secuencias complementarias pertenecientes a otros fragmentos (ver figura 10) Este trabajo lo hace la ADN ligasa que junta los dos fragmentos o dicho de otro modo genera un "splicing". Esta palabra no tiene una traducción apropiada en español, el *splicing* es un fenómeno común dentro de las células. que ocurre, por ejemplo, cuando se pasa la información del ADN al ARN m. En rigor, lo que quiere decir *splicing* es que se removió un fragmento de ADN y se volvieron a unir las cadenas sin ese fragmento. La utilidad de las enzimas de restricción se muestra porque con su ayuda es posible insertar trozos de ADN en otro ADN o remover genes con el propósito de conocer su función.



ACCIÓN DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN Eco R1

Figura 10. La enzima Eco R1 corta en la cadena del fragmento 1 y el mismo tipo de corte en el fragmento 2. Estos cortes los realiza cuando encuentra las secuencias blanco, mostrada en la figura 9. Deja entonces dos extremos complementarios (pegajosos) que luego son ligados por la ADN ligasa, por último se obtiene un ADN recombinante. El análisis de la figura justifica nuestro título de tijeras moleculares.

Clonado molecular

Es posible aislar una pieza de ADN, eventualmente un gen de interés y clonarlo en un vector que le sirva para facilitar la expresión exclusiva de la proteína codificada por el gen. Esta es una de las aplicaciones más exitosas del ADN recombinante producida por ingeniería genética. Como ejemplos notables tenemos la producción de insulina o de vacunas contra virus como el de la hepatitis B. Veamos el proceso con cierto detalle.

Plásmidos.

Son moléculas de ADN doble cadena circular que se encuentran dentro de las bacterias. Están separadas físicamente del cromosoma de la bacteria (ver figura 11) y se duplican en forma independiente. Los plásmidos se encuentran también en otros microorganismos como las levaduras. En una bacteria puede haber más de un plásmido, una de las funciones que cumplen es conferir a las bacterias resistencia a los antibióticos.

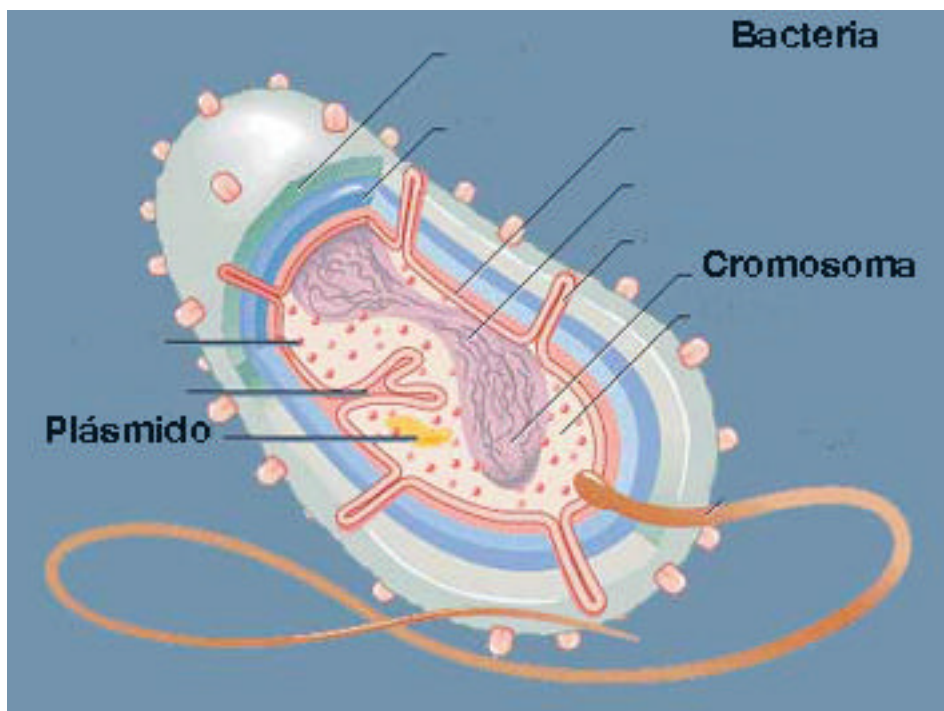


Figura 11. Esquema de una bacteria en forma de maní con un flagelo. Por razones de simplificar no se aclararon los nombres de los distintos componentes. Volviendo al maní es como si se hubiera quitado parte de la cubierta, vemos pintado en amarillo un plásmido mientras que el cromosoma aparece en lila y es mucho mayor que el plásmido. Los puntos representan el citoplasma bacteriano, se observan también los cortes de las capas que recubren al microorganismo.

Los plásmidos pueden aislarse a partir de las bacterias y tenerlos en un tubo de ensayo, el análisis de las partes funcionales de un plásmido han sido estudiadas y se muestran en un esquema modelo que se presenta en la figura 12.

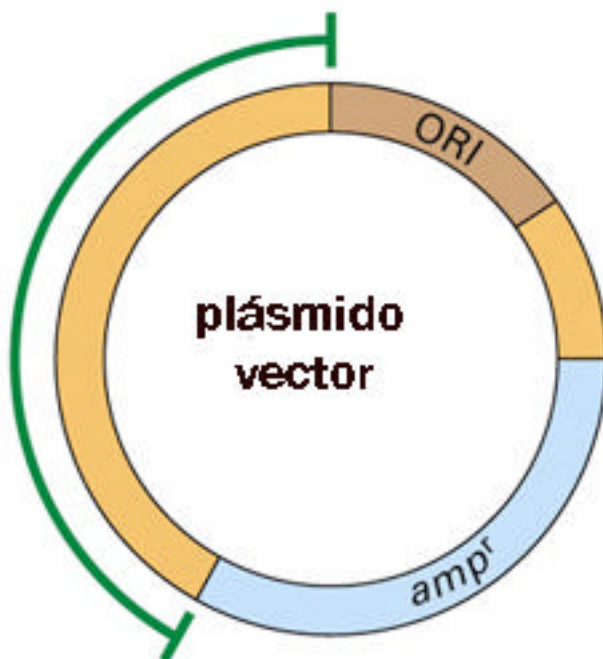


Figura 12. Dibujo esquemático de un plásmido que muestra resistencia a un antibiótico, en este caso es resistente a la ampicilina. El plásmido está dividido en distintas regiones, generalmente se lee como las agujas del reloj. ORI es el lugar de origen de la replicación, si no existe esta parte del ADN no se replica el plásmido. Hay otro gen (en celeste) que es el que le da resistencia al antibiótico esto quiere decir que una bacteria que lo porte podrá crecer normalmente en un medio conteniendo ampicilina. Por último hay un sector señalado con verde que puede ser separado del plásmido y reemplazado por otro ADN, en este lugar se puede colocar el gen de interés utilizando la técnica del ADN recombinante.

A continuación en la figura 13 veremos la técnica de inserción de genes, para su entendimiento recomendamos repasar las nociones presentadas anteriormente sobre las enzimas de restricción.

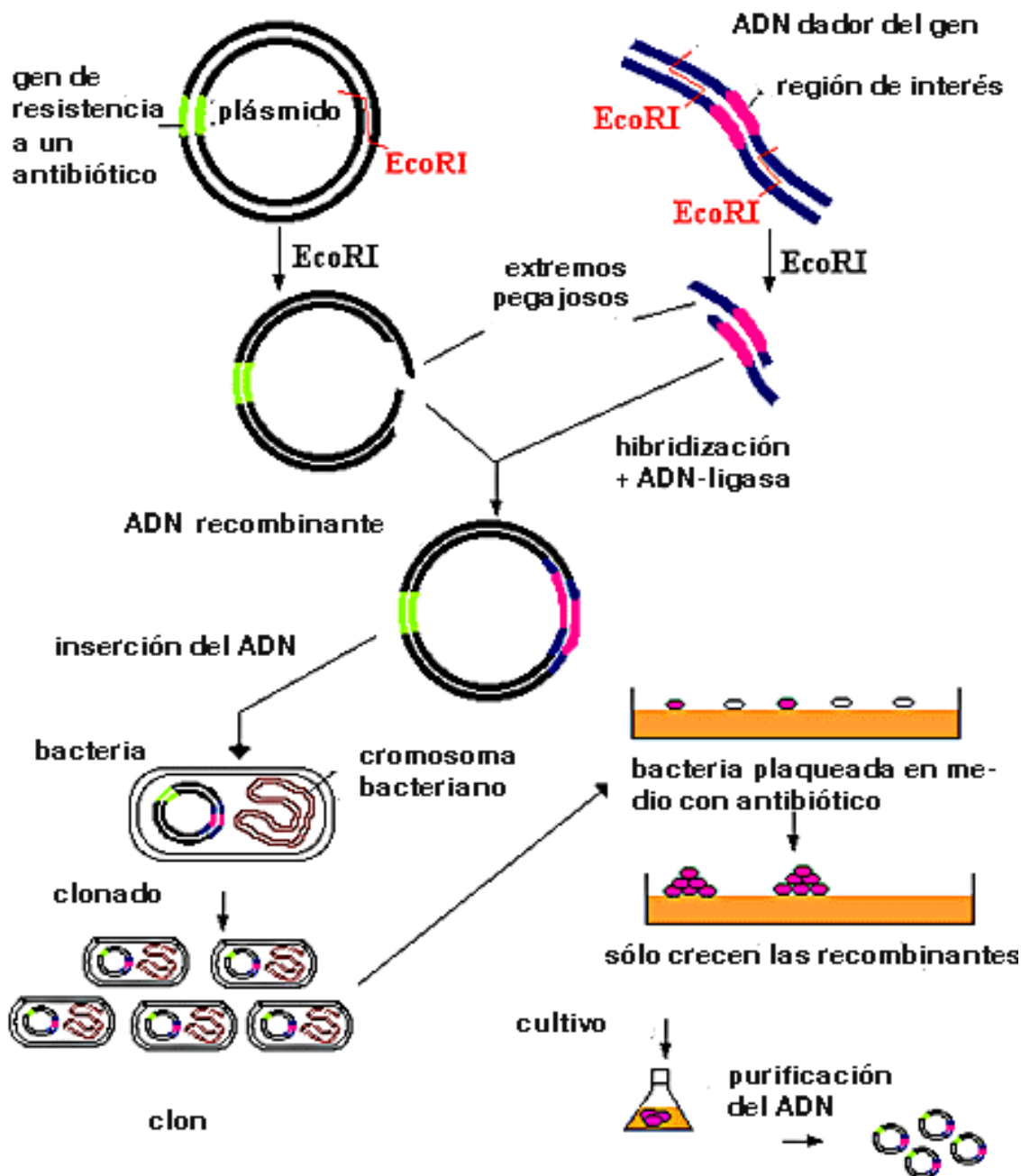


Figura 13. Procedimiento de inserción de un gen en un plásmido y amplificación del ADN clonado. Tanto el plásmido como la secuencia blanco del ADN a clonar se cortan con la misma enzima, en este caso Eco R1 que produce extremos pegajosos. Al mezclar en un tubo de ensayo el ADN plasmídico y la secuencia de ADN foráneo se hibridan y luego de la acción de una ligasa agregada al medio forman un plásmido híbrido que contiene el gen de interés. Luego se procede a transferir el ADN recombinante a una bacteria, este proceso es fácil de realizar. Se procede luego a transferir las bacterias a un medio de cultivo donde se multiplican. A partir de este crecimiento se siembran en un medio sólido (ver figura 14) conteniendo el antibiótico al que es resistente la bacteria que porta el plásmido, es decir que sólo van a crecer las bacterias que contienen el ADN recombinante. Luego a partir de las colonias se hace un cultivo en medio líquido para amplificar y de ese cultivo se purifica el ADN con el inserto.

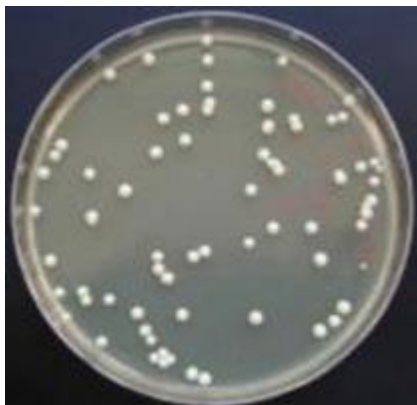


Figura 14. Placa de petri con una capa de agar nutritivo donde crecen las colonias de bacterias, cada colonia (botón blanco) equivale a un clon, lo que significa que fue originado por la división de una sola bacteria.

Conclusiones

Hemos visto en esta primera parte sobre **Herramientas moleculares** los fundamentos básicos que permiten una comprensión elemental de este tema de tanta actualidad y que ha permitido cambios notables en la manufactura de muchos productos de naturaleza farmacológica. En las segunda y tercera parte continuaremos explicando principios básicos y veremos ejemplos concretos del uso de la tecnología molecular. El contenido de este capítulo ha sido escrito en base a mis conocimientos y a la consulta de la Wikipedia. la enciclopedia de Internet. Las figuras fueron obtenidas de diferentes páginas ofrecidas en Internet y modificadas por mí traduciéndolas al español. De no contar con la ayuda de tantas personas anónimas pero habilidosas este capítulo no resultaría didáctico.

Capítulo 14

Herramientas moleculares: Biotecnología

Parte 2.



Introducción.

Vimos en el capítulo anterior los conocimientos indispensables para entender algunas de las reacciones biológicas que se utilizan en la actualidad y cuyos nombres trascienden ya al público en general. Sin embargo, los lectores sabrán comprender que pretender resumir en un único capítulo lo ocurrido con la Biología Molecular en un período mayor de 50 años significa reducir los conocimientos a las explicaciones más elementales. Por ello hemos dado cuenta de los procesos generales sin aclarar los detalles. Hoy en día, se dispone de mucha bibliografía de consulta para completar el tema, tarea que podrán encarar todos aquellos insatisfechos con la información brindada en el capítulo 13. En la sección sitios de la página de Quimicaviva encontrarán algunos recursos útiles para ello.

En esta segunda parte, continuaremos con una forma sencilla de presentación de las aplicaciones concretas de las técnicas derivadas del conocimiento de la Biología Molecular. Nuestro objetivo es lograr que el lector incorpore información, que se complica muchas veces por el uso abundante de abreviaturas y códigos. Es comprensible que el uso reiterado de una abreviatura en lugar del nombre completo facilite la escritura pero muchas veces la abreviatura puede resultar apta para nombrar más de un término y es entonces cuando en lugar de aclarar, oscurece. A modo de guía de cómo se desarrollará este capítulo, repetimos la figura 1 del capítulo 13 y trataremos de explicar cada una de las derivaciones señaladas en el esquema.

Alcances de las técnicas moleculares.

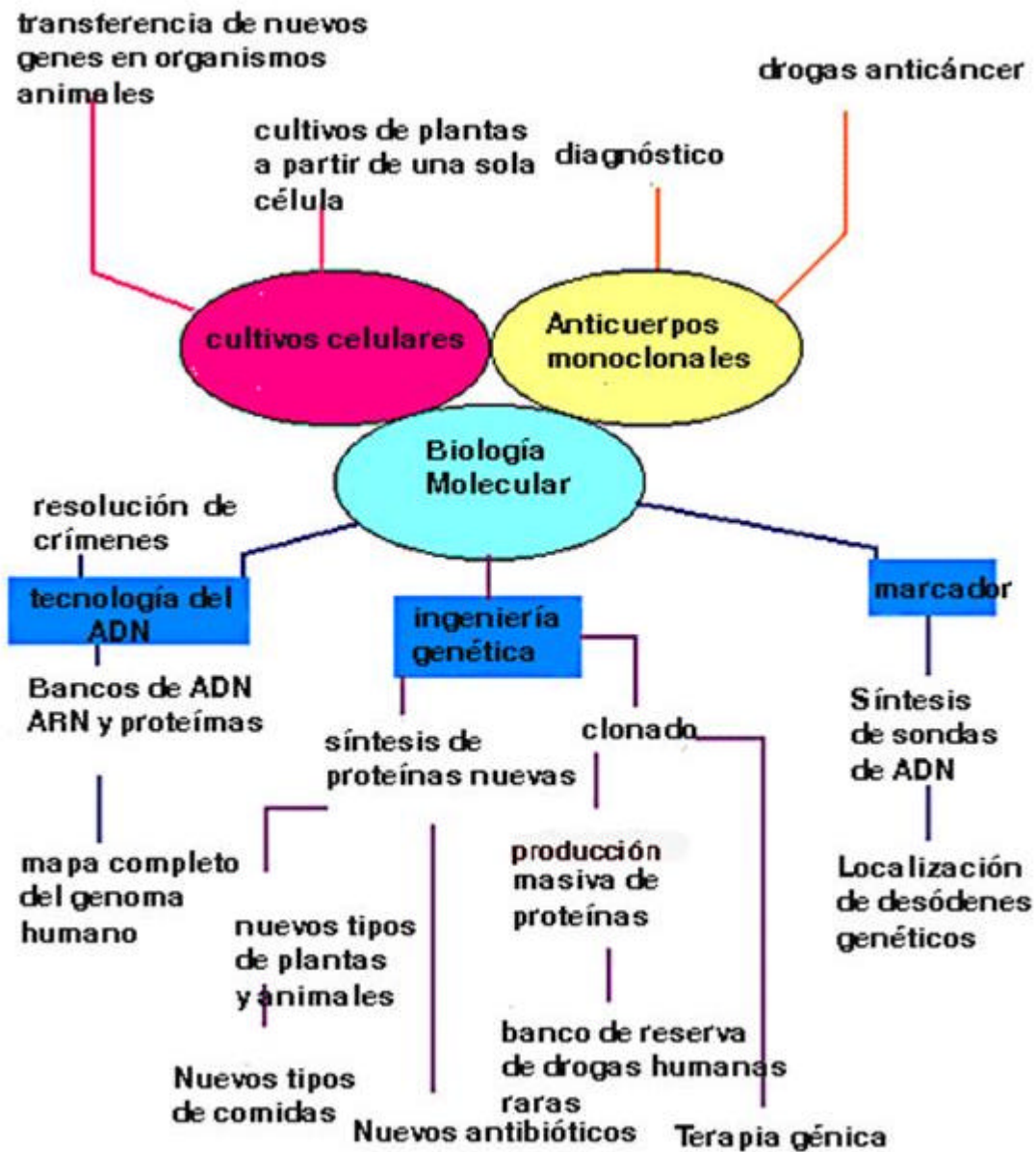


Figura 1. Esquema de los alcances del uso de la tecnología del ADN recombinante.

Ingeniería genética

La ingeniería genética se define como la alteración deliberada del genoma de un organismo por medio de la manipulación de su ADN de modo de producir un cambio en sus características hereditarias. Como toda definición, la de ingeniería genética es breve y concisa. Sin embargo, quisiera realizar algunos comentarios. Es cierto que la ingeniería genética es una alteración deliberada del genoma de un organismo, dicho de otro modo, es el cambio de un gen o genes por el/los de otro organismo con técnicas de laboratorio. Pero no siempre la ingeniería genética se aplica con ese objetivo de producir cambios en las características hereditarias. Esta técnica va más allá, de la producción de organismos rediseñados como nuevas especies,

permite también otras aplicaciones como la terapia génica, la producción de reactivos y el diseño de equipos para diagnóstico e investigación.

Más herramientas moleculares.

En el capítulo 13 estudiamos las técnicas del ADN recombinante que tienen que ver con el uso de una molécula de ADN como molde e hicimos hincapié en los casos de la transferencia de información del ADN al ARN, nos falta discutir sobre una técnica conocida como **transcripción reversa** de uso tan común como la descrita antes. La transcripción reversa, se denomina así porque utilizando un molde de ARN es posible sintetizar ADN, usando para ello la enzima transcriptasa reversa.

Por un período que abarcó desde la publicación de la estructura del ADN hasta la demostración de la existencia de la transcriptasa reversa ocurrida en 1970 el dogma central de la biología molecular era el presentado en la figura 2. El estudio de la replicación y comportamiento de un grupo de virus causantes de leucemia y tumores en animales cuyo genoma o ácido nucleico era ARN llevó a sospechar que replicaban a través de un ADN intermediario.

En el año 1970 H.Temin y D.Baltimore recibieron el premio Nobel por su descubrimiento de la enzima **transcriptasa reversa**, responsable de transcribir ADN usando una hebra de ARN como molde, aislada a partir de partículas virales. Posteriormente a este espectacular hallazgo este grupo de virus pasó a denominarse **retrovirus** y a la familia a la que pertenecen **Retroviridae**. Hay que lamentar que un virus miembro de esta familia, de reciente aparición, ha matado ya a más de dos millones de personas, se trata del virus HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) agente causal del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Nosotros preferimos llamar al virus HIV y no VIH (su forma española), porque los virus tienen una nomenclatura universal en la que la V de virus se pone al final, HIV significa *human immunodeficiency virus*.

ADN

ARN

Proteína



Figura 2. Muestra el flujo de información del dogma central de la biología molecular, flechas verdes). La flecha roja muestra que el flujo contrario también existe, es la llamada transcripción reversa.

Resumen breve de lo aprendido hasta ahora en este capítulo y en el anterior.

- Los principios de complementariedad entre las bases que forman el ADN para asegurar la síntesis de cadenas idénticas.
- La importancia de las uniones hidrógeno que permiten dicha complementariedad.
- La existencia de las enzimas de restricción que permiten cortar al ADN en numerosos fragmentos dejando la posibilidad de insertar en la cadena cortada, fragmentos de ADN de otros organismos.
- La importancia de los plásmidos en el clonado molecular.
- La hibridización molecular entre cadenas ADN/ADN ó ADN/ARN.
- La transcripción reversa que permite la síntesis de ADN a partir de ARN.
- La necesidad de un cebador o primer para iniciar la síntesis de cadenas nuevas.
- Saber que la replicación del ADN es semiconservativa.

Hasta este punto todo lo que aprendimos tuvo que ver con los aspectos teóricos del campo molecular del ADN sin entrar en detalles de cómo esos procesos ocurren dentro de una célula y cómo se llevan a cabo en el laboratorio. Presentaremos a continuación los fundamentos de algunas técnicas en uso, necesarias para realizar experimentos con ADN en el laboratorio.

Electroforesis en gel: técnica para separar fragmentos de ADN.

La electroforesis en gel es una técnica ya conocida desde hace mucho tiempo que se usa para separar moléculas en base a sus características físicas tales como tamaño, forma y punto isoeléctrico¹. Es útil para separar fragmentos de ADN de distinto tamaño y aplicar en forma analítica (para el análisis directo) o preparativa (conseguir una cierta cantidad), es el caso cuando se purifican moléculas antes de aplicar otros métodos. Específicamente, la electroforesis aplicada al ADN se usa para purificar moléculas que serán usadas, entre otros objetivos en la reacción de PCR (reacción de polimerasa en cadena), clonado molecular, secuenciación y técnicas de inmunotransferencia.² La electroforesis en gel ha tenido su mayor aplicación para la separación de proteínas.

Para realizar una electroforesis se debe elegir un soporte (papel, celulosa, poliacrilamida, agar) sobre el que se siembra la muestra y sumergir el soporte en una solución dentro de una bandeja. Cuando se separan proteínas o ácidos nucleicos cortos (oligonucleótidos) se usa acrilamida, según la concentración de acrilamida se forman geles de distinta porosidad. Para asegurar el entramado del gel se agrega una sustancia que favorece el entrecruzado formando así el gel conocido como poliacrilamida que se diseña de acuerdo al tipo de moléculas que se desee separar. Recordemos que la poliacrilamida es un neurotóxico y debe ser manipulada con cuidado. Para el caso del ADN el soporte ideal es un gel de agarosa (no tóxica), en especial para moléculas de ADN de gran tamaño. Esta sustancia proviene de un alga marina. La agarosa se vende en polvo y se disuelve en agua destilada por calentamiento, al dejar enfriar la solución en un molde apropiado de forma rectangular o circular (caja de Petri) forma una capa de un material parecido a la gelatina

pero más consistente que tiene una matriz conteniendo poros o canales. La electroforesis permite separar las moléculas por tamaño sometiéndolas a la acción de un campo eléctrico. Las moléculas se moverán dentro de la matriz del soporte, a través de los canales del agar. hacia uno de los polos y la velocidad de migración dependerá de su tamaño, cuanto más pequeñas sean se moverán más rápidamente. La figura 4 muestra un aparato de electroforesis horizontal con sus conexiones, mientras que la figura 5 muestra un aparato vertical.

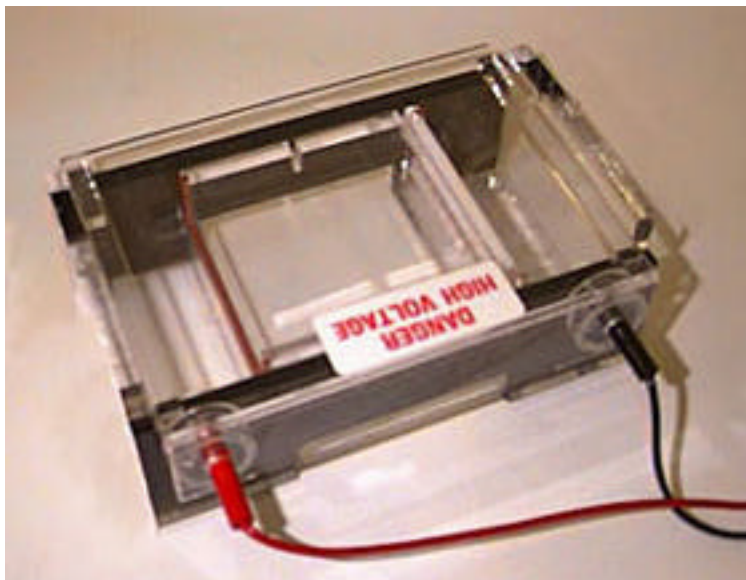


Figura 4. Aparato de electroforesis horizontal, los cables se conectan a una fuente de poder. En las canaletas se coloca la solución buffer y en el centro del aparato se apoya la muestra sembrada sobre una capa de agar sobre un soporte de vidrio. Mediante un artefacto llamado peine se crean una serie de calles en el agar por las que correrán las muestras de ADN o de proteínas.

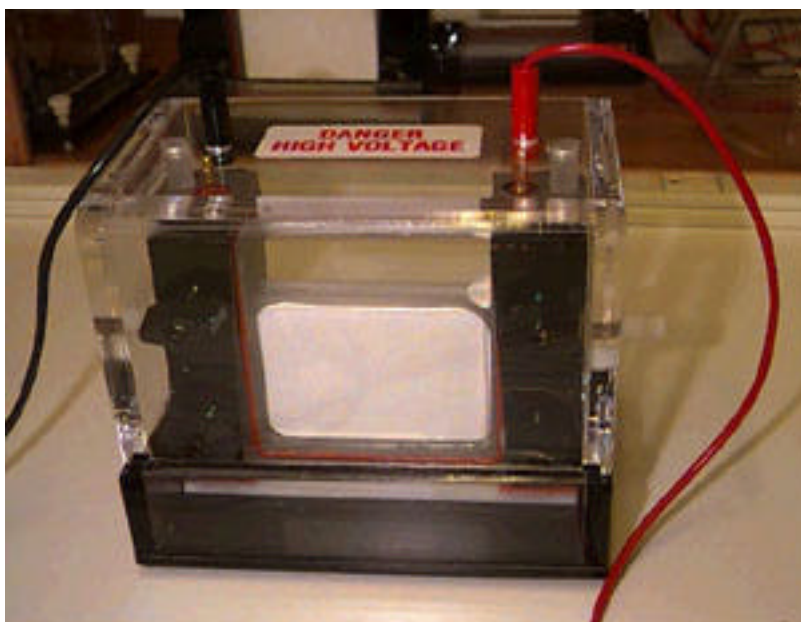


Figura 5. Aparato de electroforesis vertical.

Cuando se aplica la corriente eléctrica al gel, la fuerza electromotriz mueve a las moléculas a través de la matriz del gel hacia el ánodo (electrodo positivo) si las moléculas están cargadas negativamente o hacia el cátodo (electrodo negativo) si están cargadas positivamente. Para el caso de los ácidos nucleicos, éstos tienen cargas negativas debido a su esqueleto azúcar-fosfato (ver capítulo 13).

Las proteínas pueden tener formas complejas y cargas diferentes en consecuencia puede ser que proteínas del mismo tamaño no migren en el gel a velocidades similares. Por esa razón las proteínas se desnaturalizan en presencia del detergente dodecil- sulfato de sodio más conocido como SDS. Este detergente recubre a las proteínas con una carga neta negativa. Además, la cantidad que se une es proporcional al tamaño de la proteína de modo que este tratamiento les confiere una carga negativa y además todas las proteínas tienen una carga similar relacionada a su masa. Las proteínas desnaturalizadas toman la forma de bastones largos y en consecuencia la velocidad de migración en el gel no depende de la carga y forma sino de su tamaño. En la figura 5 se muestra una corrida electroforética de proteínas.

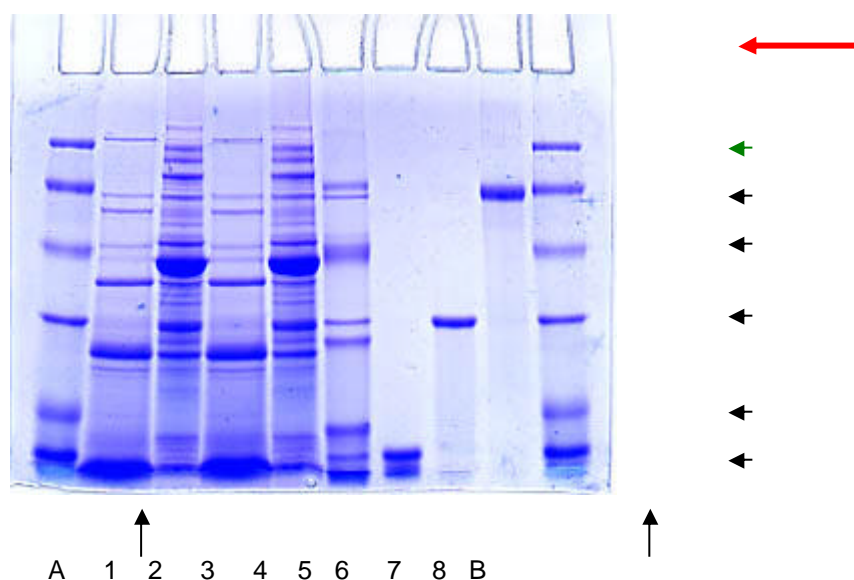


Figura 6. Gel de proteínas. Corrida de electroforesis de mezclas de proteínas reveladas con coomassie blue. Las flechas (A y B) indican las calles donde se sembró la mezcla de proteínas de referencia. Los números indican las calles de siembra. Si observamos con detenimiento, sin tener referencias exactas de este experimento, vemos que en las calles 1 y 3 se ha sembrado la misma muestra. Lo mismo ocurre si comparamos las calles 2 y 4. En las calles 7 y 8 hay una sola proteína pero no es la misma ya que su posición relativa en el gel es muy distinta. La flecha roja muestra la serie de muescas que se hacen utilizando la ayuda de un peine especial, estas muescas delimitan las calles en donde se siembran las muestras. Las cabezas de flechas verde y negras muestran las bandas correspondientes a las proteínas cuyo peso molecular se conoce. En los bordes de los geles las corridas suelen deformarse, observar el extremo izquierdo y compararlo con el derecho.

Tal como describimos antes las calles extremas del gel de la figura 5 contienen una mezcla de proteínas de distinto peso molecular (escalera) y las calles del centro permitieron analizar distintas mezclas de proteínas conteniendo varios constituyentes. El peso molecular de cada banda se puede calcular por referencia a los pesos moleculares patrones.

La figura 7 muestra un gel para ADN.

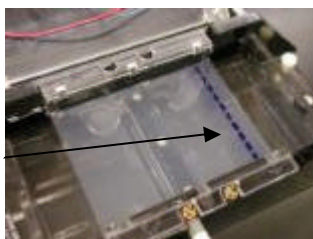


Figura 7. La flecha parte desde el lugar de siembra, la presencia de un colorante permite visualizar el lugar de la siembra. A su vez, a medida que transcurre la electroforesis el colorante permite observar el frente de la corrida y de ese modo permite elegir el momento de corte, antes de que salgan del gel. Cada segmento coloreado corresponde a una calle donde se puede correr una muestra en particular

Cuando se desea teñir ADN se puede recurrir al bromuro de etidio, a un colorante fluorescente o la muestra puede contener un nucleótido radiactivo. Así es posible fotografiar la corrida iluminada con rayos ultravioleta. Si la muestra contiene un nucleótido radiactivo, se revela por autorradiografía. Métodos y tinciones hay muchos lo importante aquí es que los lectores adquieran el concepto de cómo se pueden separar las moléculas según su tamaño. Las moléculas de ADN doble son casi bastones por lo que al igual que las proteínas su velocidad depende de su tamaño. En la figura 8 se ve un ejemplo de corrida de ADN, es la misma muestra de ADN cortada con distintas enzimas de restricción (ver capítulo 13). Cada enzima da lugar a un patrón de corte diferente de acuerdo con la secuencia del ADN cortada.

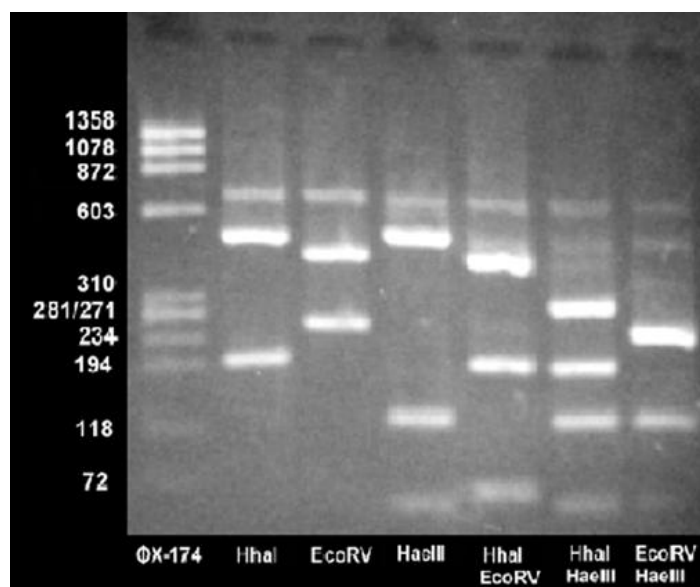


Figura 8. Patrón de restricción de una muestra de ADN, en la calle de la izquierda se corrió la muestra patrón que permite determinar los pesos moleculares. En las calles siguientes la misma muestra de ADN fue sometida a la acción de diferentes enzimas de restricción cuyos nombres figuran en la base de la corrida.

Momento de recapitular

Ya aprendimos cómo puede separarse una muestra de ADN sólo falta que la saquemos del gel, para eso cortaremos la banda del agar y la obtendremos en forma pura, pero antes de detenernos en cómo hacerlo vamos a ver las aplicaciones directas. Al tener separado un trozo de ADN correspondiente a un gen viral podríamos, por ejemplo, producir un biofármaco.

Ejemplo de aplicación de las técnicas moleculares: Obtención de la vacuna contra el virus de la hepatitis B.

Los virus además de ser extremadamente pequeños (sólo pueden ser vistos con el microscopio electrónico) están compuestos por una genoma rodeado de proteínas que protegen a este ácido nucleico y además le permiten saltar de célula en célula para poder multiplicar ya que son parásitos obligados. Es decir que sólo pueden reproducirse dentro de una célula ya que ésta contiene todos los elementos necesarios para sintetizar ácidos nucleicos.

La figura 9 muestra un corte esquemático de la partícula del virus de la hepatitis B.

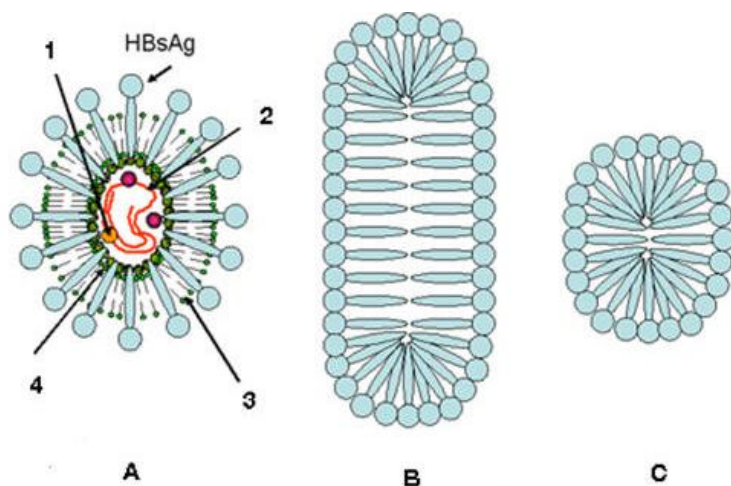


Figura 9 El diagrama A muestra a la partícula de virus completa conocida con el nombre de partícula de Dane, cuyo tamaño es de 40 nm. 1. Enzima polimerasa, 2. ADN, 3. core (núcleo interno) 4. Membrana. Se destaca en la membrana el antígeno HBsAg denominado así por ser el antígeno o proteína viral de superficie. En la sangre de las personas infectadas circulan también dos tipos de partículas más que no son infecciosas porque carecen de ADN. La partícula B es filamentososa con una longitud de 200nm y la C que es esférica de 20 nm de diámetro. Este dibujo modificado del original se obtuvo de: <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus.htm>

Cuando un virus ingresa a un organismo, el organismo mediante el auxilio del sistema inmune sensa que hay proteínas extrañas circulando por ahí. Entonces como estudiamos en el capítulo 8 de este curso, primero aparecerá una respuesta natural innata y luego de un tiempo una respuesta inmune específica.

¿Qué es lo que ven las células del sistema inmune que las alertan? Ven, reconocen o sensan antígenos (proteínas externas del virus) que para el caso del virus de la hepatitis B vemos que se trata del antígeno de superficie HBsAg como se muestra en la figura 9 A. La pregunta que se hicieron los científicos

especializados en diseñar vacunas fue la siguiente. Si insertamos el gen responsable de que se sintetice el antígeno de superficie en una bacteria ¿produciría ésta grandes cantidades de antígeno?. Les adelanto la respuesta, sí lo produce pero como el antígeno debe ser glicosilado (se le adicionan azúcares) para ser efectivo y las bacterias no tienen sistema de glicosilación la proteína que se forma no es inmunogénica. Entonces se les ocurrió insertar el gen del virus de la hepatitis B en una levadura. La tan conocida *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en la producción del pan y de la cerveza. La levadura, sí tiene cómo glicosilar a la proteína codificada por el gen S, responsable del antígeno, y lo produce en cantidad. Luego esa proteína es purificada y combinada con ión magnesio para ser administrada como vacuna. La ventaja de esta vacuna es que no contiene virus.

Veamos entonces cómo se procedió a obtener el gen del HBsAg, para ello nos vamos a detener en la figura 10 que muestra una representación del genoma del virus de hepatitis B.

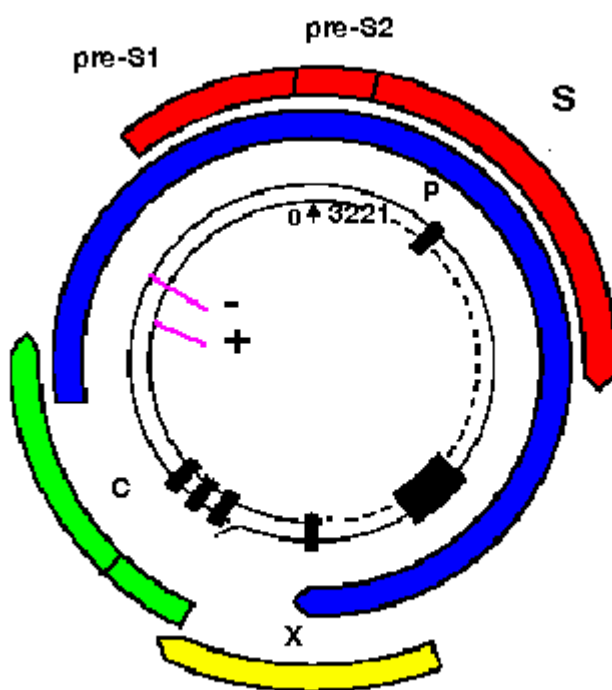


Figura 10. Genoma del virus de la hepatitis B <http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/HBV.html>. Los dos círculos negros indican que se trata de un ADN circular doble cadena aunque una porción dibujada con rayitas es de cadena simple. Por convención, a una de las cadenas se la denomina menos (-) y la otra es más (+). Se muestra el origen de la replicación en el 0 y al lado el número 3221 que se refiere al número total de nucleótidos que tiene el genoma viral. Las flechas de colores muestran el tamaño de los genes y el sentido de su lectura. En azul se señala el gen de la polimerasa viral (P), en verde la proteína de la cápside C (cubierta viral), en amarillo el gen X que no tiene una función definida y en rojo el gen S correspondiente al antígeno de superficie. Nótese que hay dos regiones pre-S1 y pre-S2 que no son necesarias para la expresión del gen S en un vector.

Es interesante destacar que los genes poseen nucleótidos compartidos (se superponen) es lo que se

conoce con el nombre de genes solapados, si miramos la figura vemos, por ejemplo, que el gen S tiene una región común con el gen P, pero al empezar en otro nucleótido y terminar previamente resulta un polipéptido diferente. Esta situación refleja la exquisita regulación de la información creada por los virus para subsistir, así un genoma tan pequeño como el del virus de la hepatitis B codifica por cinco proteínas.

Volviendo a los pasos de la obtención de la vacuna contando ya con el conocimiento de las técnicas.

1. Localización del gen S en el genoma viral
2. Corte con enzima de restricción.
3. Separación del ADN en un gel de agarosa.
4. Obtención del ADN.
5. Recombinación con un plásmido bacteriano (ver figura 12 del capítulo 13)
6. Producción de bacterias conteniendo los plásmidos
7. Recombinación del plásmido bacteriano con uno de levadura para su expresión.
8. Crecimiento de la levadura recombinante en tanques de fermentación.
9. Purificación de la proteína HBsAg a partir del líquido del cultivo.
10. Formulación para la vacuna. Envasamiento y distribución.
11. Aplicación inyectable. Inmunización-vacunación específica.

Conclusiones

He tratado de explicar en la forma más sencilla posible las técnicas moleculares desarrolladas a partir del conocimiento de la estructura del ADN y de las enzimas de restricción así como el principio de otras técnicas de uso común en los laboratorios. Los que deseen aprender en profundidad pueden consultar libros de texto o la información que se brinda en Internet, ésta última de gran valor suele tener, sin embargo, algunos errores. Creo conveniente reservar para un próximo capítulo la explicación de otras técnicas de aplicación general como la inmunotransferencia y la PCR.

1. *Punto isoeléctrico: la carga de una molécula de proteína variará según el pH de la solución en que se encuentre. El punto isoeléctrico de una proteína es el pH al cual la carga neta de la molécula es cero.*

2. *Inmunotransferencia esta técnica se explicará en el capítulo 15*

Capítulo 15

Herramientas moleculares: Biotecnología

Parte 3.



Introducción.

En este tercer capítulo de la serie **Herramientas moleculares** abordaremos, entre otros, el aprendizaje de dos técnicas nuevas la inmunotransferencia y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Veremos además qué son las sondas de ADN y el uso de los ratones transgénicos y detallaremos ejemplos de aplicación práctica, con ello habremos completado las expectativas planteadas en la figura 1 de los capítulos 13 y 14. A esta altura de los conocimientos, sobre todo cuando asumimos que nuestros lectores no disponen de algunos conocimientos básicos, la información no siempre se puede brindar en un orden lógico absoluto, a veces es necesario aceptar un término nuevo sin mayores explicaciones ¡pero no desesperar! porque renglones después todo, absolutamente todo, será explicado.

Sondas moleculares de ADN o ARN.

Una sonda (**probe** en inglés) es un artefacto que permite medir la profundidad del fondo del mar. También una sonda, aplicada en Medicina, es un tubo que se introduce en un órgano o conducto determinado ya sea para toma de muestra, para observar un tejido o para alimentación. El sentido es el mismo, la búsqueda de algo con una especie de detector. Cuando hablamos de sondas de ADN o ARN nos referimos a segmentos de ácido nucleico de cadena simple utilizados como anzuelos para detectar una pieza de ADN fija en un soporte o suelta dentro de una sopa de moléculas. Como podemos ver en la figura 1 la utilización de una sonda para localizar genes (por ejemplo) se basa en el principio de la complementariedad (ver capítulo 13). La atracción, como si fueran imanes, entre dos hebras complementarias de ADN simple cadena o entre una hebra de ADN y una de ARN siguiendo esta regla: A-T/C-G/T-A/G-C/. Es decir si en una de las hebras hay A en la complementaria habrá T y viceversa, también si en una hebra hay C en la otra habrá G y viceversa. La excepción es el ARN que en lugar de T tiene uracilo (U). En este caso la U se comporta como la T, es decir, complementa con A.

Recordando este patrón bastará que la sonda esté marcada con un fluorocromo (grupo químico que fluoresce expuesto a la luz) de una determinada longitud de onda o con un isótopo radiactivo como para poder revelar a qué segmento de ácido nucleico se pegó la sonda. De esta manera podremos averiguar si lo que estamos buscando se encuentra en la muestra.



Figura 1. Interpretación artística de cómo funciona una sonda. La pintura fue encontrada en las páginas del buscador Yahoo utilizando la palabra anzuelo. Nos pareció que la atracción ejercida sobre el pez por el anzuelo refleja lo que ocurre entre secuencias que se complementan. Desconocemos el nombre del pintor. El asterisco * señala la sonda marcada.

Si ustedes recuerdan lo aprendido en el capítulo 13 se trata de una reacción de hibridación de ácidos nucleicos.

Las sondas pueden obtenerse mediante diferentes metodologías, ya sea mediante reacciones biológicas moleculares o por síntesis química agregando nucleótido por nucleótido hasta completar como máximo un polinucleótido de 150 unidades, la forma de obtención se esquematiza en la figura 2.

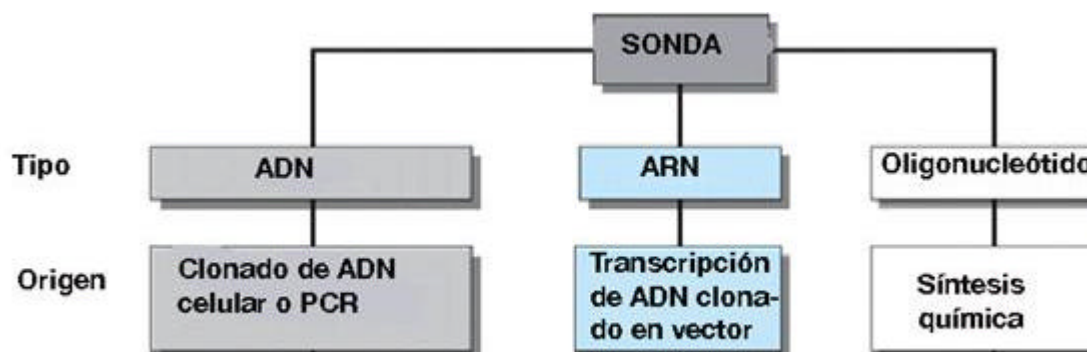


Figura 2. Tipos y modos de obtención de sondas moleculares.

Aplicaciones del uso de sondas. Nuevas tecnologías

La aplicación de dos de las técnicas que hemos visto: las sondas de ADN o ARN y la reacción de hibridización ha conducido a nuevas tecnologías de reciente aplicación conocidas como micromatrices (**microarrays**) de ADN o chips de ADN . Se trata de una manera nueva de estudiar un gran número de genes en forma simultánea y se espera una aplicación universal en la ciencia y en la vida diaria en un futuro próximo. Para llevar a cabo esta técnica y crear las micromatrices se utiliza una computadora para aplicar con alta precisión sobre un portaobjetos, gotas minúsculas que contienen ADN de genes. Luego las placas se hibridizan con ADN complementario (cADN) marcado en forma fluorescente o radiactiva y luego con una computadora se mide la intensidad de cada punto fluorescente o radiactivo. Hasta hace poco era posible estudiar en el laboratorio la actividad de unos pocos genes y para ello se empleaban técnicas algo complicadas. Hoy en día, la tecnología de las micromatrices está revolucionando la manera de cómo estudiar y comparar la actividad de muchos genes simultáneamente. Existen varios tipos de micromatrices, pero la más sencilla consiste en colocar ordenadamente en un portaobjetos minúsculas cantidades de oligonucleótidos correspondientes a cada gen que se quiere estudiar (P.R.Barrero. "Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro". Quimicaviva N° 3. Año 4. dic 2005).

Hay un ejemplo que he sacado de la bibliografía que se refiere a la detección de mutaciones en los genes humanos BRCA1 y BRCA2 involucrados en el cáncer de mama. El microchip de ADN consiste en un pequeño disco de vidrio encajado en un plástico parecido a un chip de computadora. En su superficie se pegan cientos o miles de secuencias sintéticas cortas de ADN de cadena simple, la suma de todas estas secuencias corresponden al gen normal entero. En este caso en particular los chips contienen la versión sintética de ADN de BRCA1 y BRCA2 en forma de oligonucleótidos sintéticos que, como dijimos más arriba, en total conforman el gen entero. Como se muestra en la figura 3 si se quiere averiguar si una paciente tiene mutaciones en sus genes se procede según se explica en la leyenda de la figura.

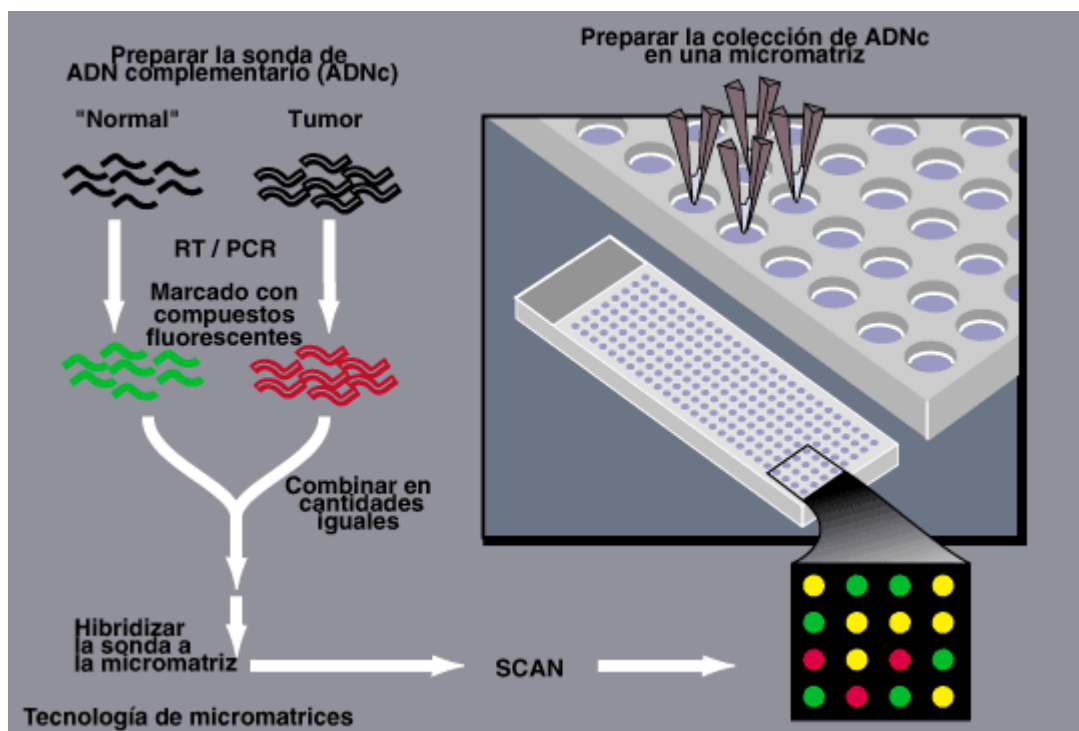


Figura 3. Se obtiene ADN de una muestra de sangre de la paciente y otra muestra que se supone no contiene mutaciones(normal). Luego se desnaturaliza el ADN de las muestras de modo de separar las cadenas dobles y obtener cadenas de una sola hebra que son cortadas luego hasta obtener moléculas más pequeñas. (La técnica de RT/PCR la veremos más adelante). Luego se marca cada conjunto de ADN con colorante fluorescente verde la normal y con colorante rojo la muestra incógnita, se combinan ambas en proporciones idénticas y se insertan en los chips de modo de permitir su hibridación o pegado. Si la persona no tiene mutaciones, ambas cadenas rojas y verdes se pegarán al chip, en ese caso cuando se lean los colores con un rayo láser se los verá de color amarillo. Si esto no ocurre porque las dos partes no se fijan bien, no hibridan, conviene investigar que está pasando, para eso el investigador tomará las muestras correspondientes y las continuará analizando.

Western blot

Es una técnica que permite detectar la presencia de una proteína en un homogeneizado o extracto de un tejido. El verbo **blot** en inglés significa manchar con tinta y el nombre Western (oeste, occidental) le fue dado por el investigador W. Neal Burnette (Analytical Biochemistry, 112:195-203, 1981) como un juego de palabras por los nombres Southern y Northern de las técnicas que se usan con el mismo fin pero se aplican a los ácidos nucleicos. Todo empezó cuando **Edwin Southern**, diseñó la técnica, que lleva su nombre, para detectar ADN, luego por oposición al punto cardinal Sur, se llamó Northern aplicada al ARN . Finalmente como una especie de broma la técnica de **immunoblotting** (inmunotransferencia) para proteínas terminó siendo denominada Western.

Para llevar a cabo un Western blot, una muestra de proteínas desnaturalizadas con SDS se someten a una electroforesis en gel (PAGE) [ver Capítulo 14]. Al cabo de la corrida obtendremos un patrón de bandas que dependerá del número de proteínas presentes en la muestra y de su tamaño. Para proceder a su transferencia a una membrana de nitrocelulosa, vamos a poner en íntimo contacto el gel con una membrana

de nitrocelulosa o PVC y los colocaremos en un aparato para que se produzca una electrotransferencia de las bandas de proteína del gel a la membrana. En ese proceso se logra una transferencia cuantitativa, manteniendo además el mismo patrón del gel. Una vez completada esta operación las bandas se revelan por el agregado de un anticuerpo específico (ver capítulos 8 y 9).

De esta forma se visualizarán las bandas de proteínas y se podrá calcular la concentración de cada una en la muestra original. Recuerden que el uso de anticuerpos le otorga a la reacción una especificidad que de otro modo no tiene. Por otra parte, los anticuerpos pueden usarse para revelar antígenos presentes directamente en muestras de células o tejidos mediante las técnicas conocidas como inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa.

Un ejemplo de la técnica se observa en la figura 4. La comparación de los

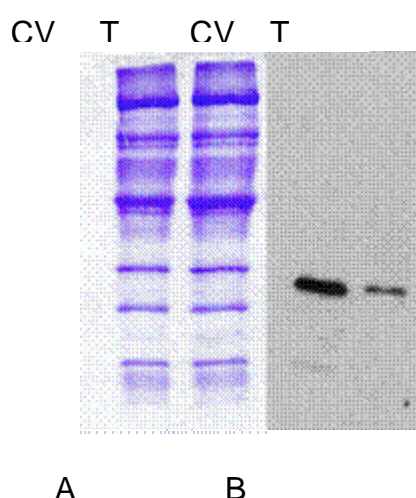


Figura 4. Western blot. En el panel A se muestra una corrida de electroforesis de mezclas de proteínas obtenidas a partir de un extracto de células infectadas con virus VSV y reveladas con coomassie blue. En el panel B se muestran los mismos extractos celulares pero luego de la corrida electroforética las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó un western blot incubando con un inmunosuero preparado contra la glicoproteína del virus. En las calles indicadas como CV, las células están infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). En las calles indicadas con T, las células están infectadas y tratadas con un compuesto con actividad antiviral. La banda que se observa en el panel B corresponde a la glicoproteína viral de VSV (Gvsv). Se puede apreciar el efecto del antiviral por la disminución del tamaño de la banda en la calle T si se compara con CV.

(La foto es gentileza de la Dra. Andrea Barquero).

patrones de los geles coloreados no muestran las diferencias que se ven fácilmente por el efecto del inmunosuero.

Aplicaciones del western blot a la medicina diagnóstica

La técnica del western blot tiene muchas aplicaciones en los laboratorios de investigación pero también ya ha sido transferida al diagnóstico de las enfermedades virales. Para el caso de las infecciones

con el virus HIV es una de las técnicas usuales para detectar la presencia de anticuerpos circulantes contra las proteínas del virus que es una indicación muy fuerte de que la persona se encuentra infectada por este virus. En la figura 5 se representa la organización estructural del virus HIV (VIH) agente causal del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

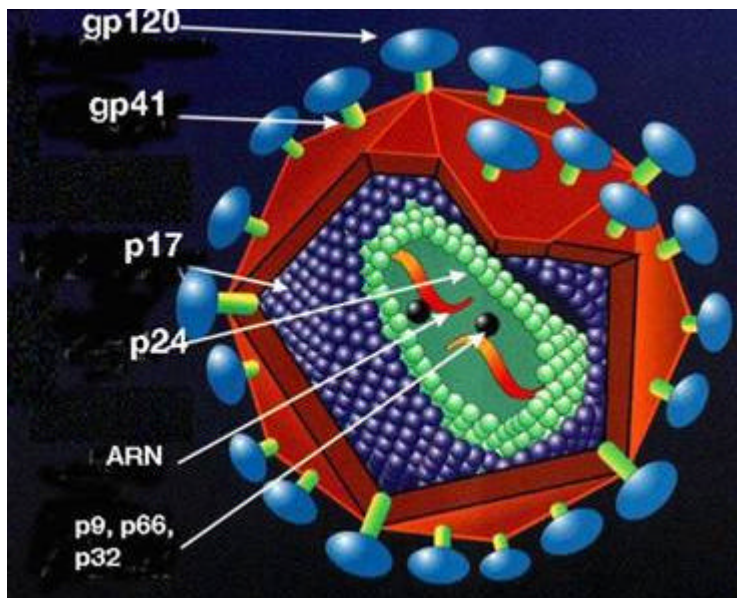


Figura 5. Estamos viendo un corte de una partícula de virus. Contiene dos copias idénticas de ARN (coloreadas de naranja) en la parte más interna del virus. Cada hebra tiene 9500 nucleótidos de longitud y es probable que estén unidas. Las dos esferitas negras representan a las enzimas transcriptasa reversa-ARNasa H* (p66) e integrasa (p32). A su vez el ARN está asociado a una proteína de nucleocápside de carácter básico (p9). El conjunto de ribonucleoproteína (ARN + p9) más las enzimas se conoce con el nombre de **core** (núcleo). El core está protegido por una especie de caja que en los virus toma el nombre de **cápside** (nombre derivado del griego que quiere decir eso mismo: caja) . Esta estructura protectora (color verde en el dibujo) tiene forma de cono truncado y está constituida por la proteína de la cápside (CA) p24. La cápside está rodeada o contenida a su vez por otra proteína (azul) conocida como la proteína de matriz (MA) p17. Ésta, a su vez, interacciona con una envoltura o membrana de dos capas. Esta envoltura (roja) la adquiere el virus al brotar de la célula, se trata de la membrana que rodea al citoplasma celular. Pero el virus inserta en la envoltura espículas o espinas (especies de pinchos) formadas de glicoproteínas (llamadas así porque son moléculas de proteínas azucaradas). Las espículas tienen forma de un hongo de sombrero. Estos honguitos tienen un tallo (verde claro) enterrado en la membrana (roja) formado por la gp41 y el sombrero (azul) está formado por la gp120. Tienen como función ser los receptores virales, es decir, los que le permiten reconocer receptores en las células que van a infectar. Una vez que se pegan a la célula se desencadena un proceso de entrada del virus que luego termina en la producción de muchos virus por cada virus que entró.

Nota: la abreviatura **p** es por proteína y el número que le sigue se refiere al peso molecular, cuando se trata de glicoproteínas la abreviatura es **gp**.

* ya vimos en qué consistía la enzima retrotranscriptasa, cuando se transcribe una hebra de ADN a partir del ARN del virus hay una enzima que debe separar ambas cadenas para que se forme como resultado final un ADN doble, esa enzima se conoce con el nombre de ARNasa H

¿Para qué complicarme la vida con la estructura del HIV? se preguntarán ustedes. No se trata de una manía de Viróloga que a toda costa muestra a un virus, la idea es que se entienda lo complejo que es este virus desde el punto de vista de su composición proteica. De acuerdo con esta realidad es de esperar que una persona infectada tenga circulando en su sangre anticuerpos contra las proteínas glicosiladas o no señaladas en la partícula viral o virión

El test del Western blot para el virus HIV se basa en la presencia de anticuerpos contra las proteínas virales mencionadas.

Vayamos por partes:

1) a partir de virus purificado y tratado adecuadamente se puede correr un gel de proteínas (PAGE) en el que aparecerán las bandas correspondientes a las proteínas del virus como se ve en el control positivo de la figura 7. Y según lo que se usó para obtener las proteínas se obtendrán otras que no forman parte del virión pero que tienen que ver con el ciclo de replicación. Recordemos que las proteínas primeramente se desnaturalizan con SDS y luego migran, por efecto de la aplicación de una corriente eléctrica, según su peso molecular.

Cuando termina la corrida se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y conservan la posición original que tenían en el gel. ¡De acuerdo a su peso molecular!

2) Luego la membrana se incuba (se pone en contacto), por ejemplo sumergiéndola, con una solución diluída del suero de una persona que se sospecha que pueda estar infectada. Luego de un tiempo, los anticuerpos contra las proteínas del virus van a reaccionar produciéndose la unión antígeno-anticuerpo (reparar el capítulo 9). Por ejemplo: si hay anticuerpos contra p24 en la banda donde se ubicó el antígeno o polipéptido p24 ahora también están los anticuerpos. FALTA VERLOS. Se hace luego un lavado de la tira, si los anticuerpos no están pegados se van con el lavado, los pegados quedan. Ahora es cuestión de revelar su presencia.

3) Para revelar la presencia de la unión específica antígeno-anticuerpo un método eficaz es el método indirecto como se muestra en la figura 6 y que fuera explicado en el capítulo 9 para la reacción de Elisa indirecta.

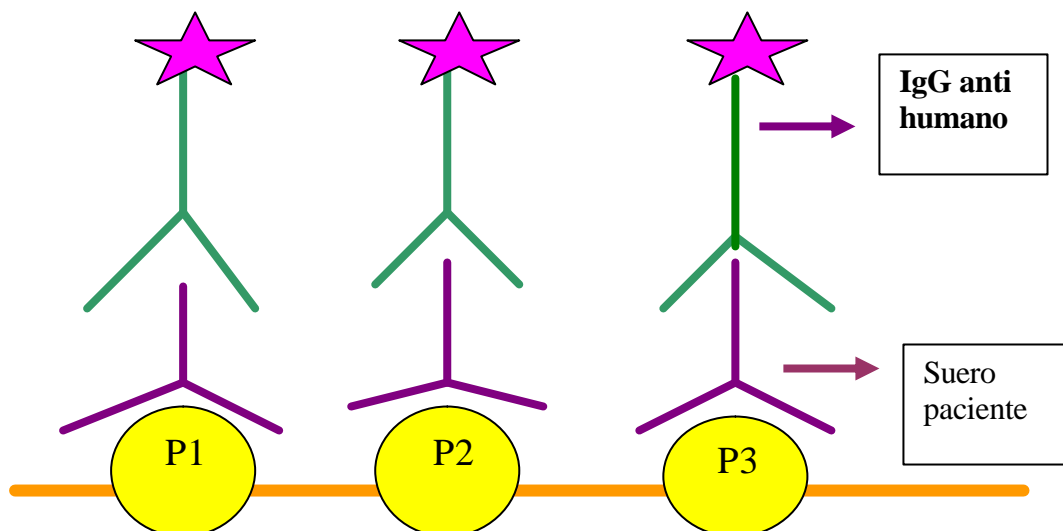


Figura 6. Esquema de revelado de las proteínas en un Western blot. Supongamos que P1, P2 y P3 son proteínas del virus HIV a las que se les pegó el anticuerpo respectivo presente en el suero del paciente. Para revelar la presencia de ese complejo lo que se hace es incubar con un segundo anticuerpo que está dirigido contra la IgG humana. Ya que si inoculamos inmunoglobulina humana (IgG) en un conejo, el animal va a fabricar anticuerpos contra ella, a la que se va a unir si se los incuba juntos. Pero estos anticuerpos fabricados en el conejo se pueden marcar o con un colorante o con un fluorocromo de modo que expuestos a la luz permitirá visualizar la presencia original de la proteína del virus presente en el suero. Resumamos: si en el suero del paciente hay anticuerpos contra una proteína del virus, que ha sido transferida a una membrana, cuando se incuba la membrana con el suero del paciente, este anticuerpo se unirá a la proteína. Al agregar un segundo anticuerpo contra la inmunoglobulina habrá una segunda reacción antígeno-anticuerpo que será visible porque el segundo anticuerpo tiene algo que lo hace fluorescer o aparecer coloreado. Un suero que no tiene anticuerpos no se pegará y la membrana aparecerá sin color.

Detección de fragmentos de ADN y ARN.

El principio de las técnicas para detectar fragmentos de ADN (Southern blot) o ARN (Northern blot) es esencialmente el mismo la diferencia reside en que para localizar las bandas de interés no vamos a poder usar anticuerpos porque los antígenos por excelencia son las proteínas y no los ácidos nucleicos. La metodología de trabajo se complica y por lo tanto creemos que no es pertinente recargar el contenido de este capítulo con detalles propios de los laboratorios de investigación.

Reacción de la polimerasa en cadena.

El propósito de esta reacción es obtener un elevado número de copias de un gen, para ello es necesario disponer de gran cantidad de cebador o primer. Tal como se observa en la figura 8 hay tres pasos importantes en la reacción de PCR que se repiten en un total de 30 a 40 ciclos. Esta tarea se realiza en un aparato llamado ciclador automático que puede calentar o enfriar los tubos de la reacción en tiempos cortos.

Paso 1 Desnaturalización de las cadenas a 94° C (recuerden que las cadenas se separan a alta temperatura). Durante el proceso de desnaturalización la cadena doble se abre y se forman dos hebras de cadena simple, además todas las reacciones enzimáticas que tienen lugar en ese momento paran, como por

ejemplo la elongación de un ciclo previo.

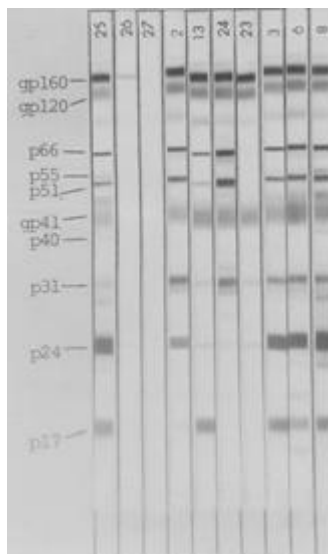


Figura 7. Western blot de varios sueros de pacientes. La primera tira muestra un control positivo, se observa además de las proteínas del virus una gp 160 que no forma parte del virus pero sí de las proteínas que aparecen durante el ciclo infeccioso. La tira con el número 27 es un control negativo. El resto de las muestras tienen bandas virales. La discusión sobre el grado de positividad de cada muestra no es de incumbencia de la información que brindamos en este curso.

Paso 2 Anillado a 54° C (recuerden el capítulo 13 en donde se explicó que al enfriarse la solución las cadenas tienden a reunirse nuevamente formando el dúplex). Los primers se encuentran flotando en la solución, de un lado a otro, o hacia arriba o hacia abajo debido al movimiento Browniano (las partículas pequeñas en una solución tienen movimientos erráticos o azarosos debido al efecto de la temperatura). Las uniones iónicas entre el cebador y la cadena simple molde se forman y rompen en forma constante hasta que al encontrarse las zonas complementarias esta unión se hace más estable y se mantiene lo suficiente para que una polimerasa se enganche al cebador y comience a copiar la cadena molde.

Paso 3 Extensión a 72° C Esta polimerasa especial aislada de bacterias que viven en aguas termales calientes, tiene como temperatura de trabajo la de 72° C. Los cebadores que están unidos débilmente a esta temperatura se separan, en cambio, los complementarios al gen tienen uniones suficientemente fuertes de modo que la polimerasa sigue copiando la cadena. Recuerden que los nucleótidos se agregan desde 5' a 3'.

Debido a que ambas cadenas se copian durante la reacción de PCR se produce un aumento exponencial del número de copias del gen. Así, si suponemos que hay una sola copia del gen antes de que se inicien los ciclos, después de un ciclo habrá dos copias, después de dos habrá cuatro, luego ocho y así sucesivamente. Un detalle más, a lo largo de los ciclos los **primers** que se usan son siempre los mismos.

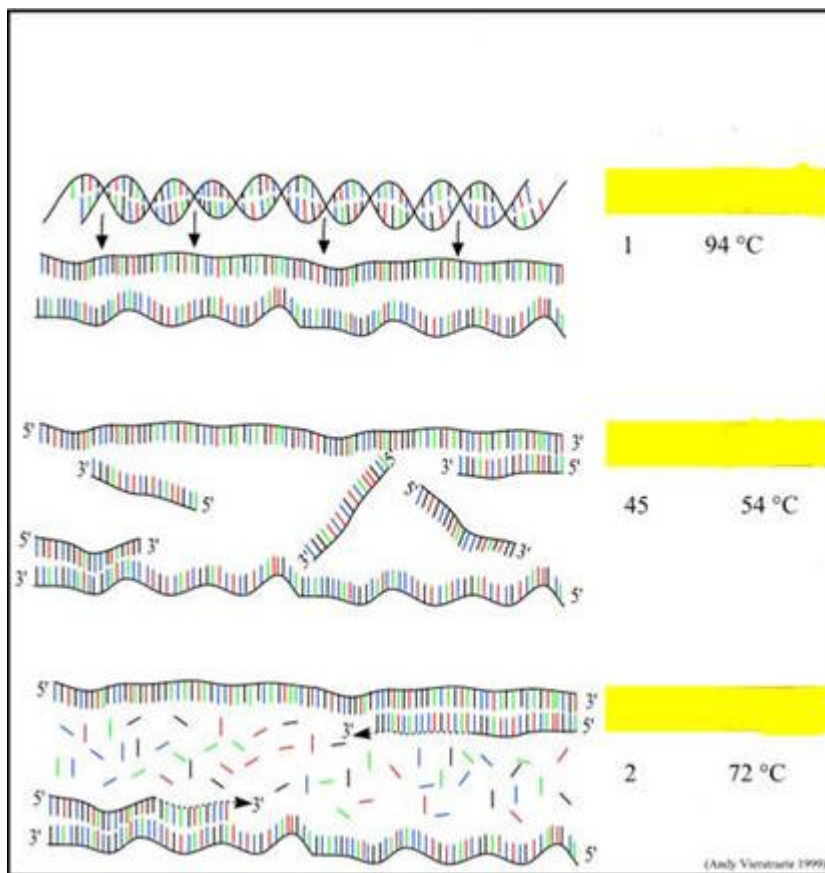


Figura 8. Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El primer paso se realiza por 1 minuto a 92°C. El segundo paso por 45 minutos a 54°C y el tercer paso por 2 minutos a 72°C.. Los guiones de colores representan los nucleótidos. Este gráfico fue tomado de:

<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>.

Puede ocurrir que la reacción haya fallado por diferentes razones por eso es necesario comprobar que el ADN que se obtuvo corresponde al tamaño del gen que se quería copiar. Para comprobar si la copia del gen sintetizado es la correcta lo que se hace es correr un gel para poder determinar si el pedazo de ADN producido en la reacción corresponde a lo esperado. Para ello los productos de la reacción se corren en un gel comparativamente con una mezcla de fragmentos de ADN de diferente tamaño. Si estamos sperando copiar un ADN de 1800 pares de bases la reacción no servirá si aparece una band equivalente a 500 pares de bases. Si observamos la figura 9 se entenderá perfectamente la situación, hay diferentes razones por las que puede fallar la reacción pero no hacen al objetivo de la información que aquí brindamos.

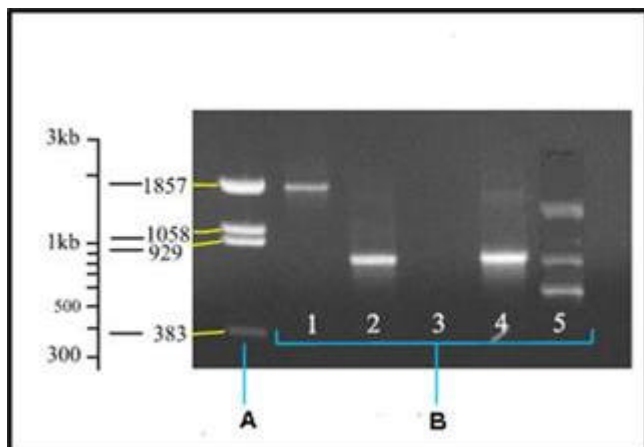


Figura 9. Gel del ADN producto de la reacción de PCR, se trata de un gel de agarosa transferido y revelado como se explicó antes. En la calle A se corrió una mezcla de ADN de diferentes tamaños, notar que la escala del eje Y es logarítmica. En la calle B 1 hay un fragmento de tamaño aproximado de 1850 bases. En las calles, 2 y 4 hay fragmentos de 800 bases de largo y en la calle 5 hay varias bandas indicando que los primers se unieron a varios genes. Mientras que en la calle 3 no hay producto, la reacción no tuvo lugar. <http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>.

De acuerdo con estos resultados sólo la muestra corrida en la calle 1 es la que deseábamos obtener. De ahora en más el ADN sintetizado podrá ser utilizado para clonar, para diagnóstico y con propósitos de investigación pura.

Ratones transgénicos.

Los ratones transgénicos son ratones que portan un gen que no les es propio, generalmente de origen humano, así pueden constituirse en modelos de estudio de enfermedades humanas y ensayo de drogas. La técnica se conoce desde 1980, los animales transgénicos son herramientas poderosas para el estudio de enfermedades genéticas ya que si bien el mismo tipo de manipulaciones puede hacerse en cultivos celulares la interacción de los transgenes con proteínas, hormonas, neurotransmisores y otros componentes del organismo sólo se pueden dar en un ambiente fisiológico sólo en el animal entero. Aplicando otras metodologías la inserción de un gen en una planta, por ejemplo, puede permitir el estudio de la resistencia a una plaga. Uno de los modos de introducir artificialmente un gen se muestra en la figura 10. En este caso el ADN inyectado se integra al cromosoma del ratón en cualquier lado (al azar), a veces, se integran copias múltiples. Algunos ratones de la primera descendencia tendrán células derivadas del implante y células que no lo son. Luego mediante cruzamiento de ratones machos y hembras se logrará obtener una camada de ratones homogénea que exprese el gen de interés.

Existe otra metodología para producir ratones transgénicos pero dejaremos la información para el lector curioso. Un ejemplo práctico de esta técnica se encuentra en haber logrado una línea de vacunos que expresan en la leche la proteínas transferrina humana.

Conclusión: Espero que estos tres últimos capítulos les haya permitido asomarse al campo de la biotecnología derivada fundamentalmente de las aplicaciones del conocimiento de la estructura del ADN. Dado el uso generalizado de estas tecnologías en la medicina e industria creemos que todos debemos conocer, al menos, de qué nos están hablando en este siglo.



Figura 10. Pasos experimentales para obtener ratones transgénicos. Se aísla un gen de interés y luego se inyecta en huevos fertilizados de ratón. Los embriones se implantan en una ratona madre sustituta, en la primera camada de hijos (dos semanas de gestación) algunos serán transgénicos. En el dibujo estos ratones aparecen en negro y son los que expresan el gen transfectado. Este dibujo se obtuvo del sitio "The National Health Museum" fue traducido para el curso. <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/transgenic.htm>.

* Este curso es una contribución de Química Viva educativa (e-Lab) a la propagación del conocimiento científico entre los estudiantes de la escuela secundaria. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

**Profesora titular consulta de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Investigadora Superior de CONICET (retirada).

e-mail: virocoto@qb.fcen.uba.ar

Capítulo 16

Ciencia y ética

por Dra.Celia E.Coto



Introducción

En el campo de la investigación, al igual que en la vida diaria, es indispensable mantener una conducta ética. La ciencia es una actividad social por excelencia y en su ejercicio se presentan numerosas situaciones en las que se deben aplicar principios éticos. No sólo se trata de cumplir con las obligaciones morales del hombre hacia los demás sino también del ejercicio del método científico, que tiene como meta arribar a la verdad del conocimiento, principio en que se basa la ciencia misma.

Existe un consenso de la comunidad científica internacional en señalar qué tipo de acciones no son éticas, sin embargo, dado que sólo salen a la luz las más graves, las transgresiones menores pasan inadvertidas. Además, salvo para los casos que se caratulan como de mala praxis que quedan dentro del ámbito de la Medicina, el resto de las faltas a la ética en el área de la ciencia no tienen puniciones establecidas por parte de la justicia. Sin embargo, en casos resonantes en los que se descubre un fraude, el desprestigio que acompañará al investigador por el resto de su vida le impedirá seguir trabajando, dado que la comunidad científica le cerrará sus puertas.

Quizás resulte más fácil enumerar primero las situaciones que son consideradas como faltas de ética y luego aclarar en qué consisten y qué gravedad revisten. Las más conocidas se listan a continuación:

- Fraude de los resultados obtenidos en las investigaciones.
- Adjudicación de autoría del trabajo de otros (plagio).
- Ignorar los trabajos pertinentes ya publicados
- Firmar trabajos por acuerdos
- Hacer firmar trabajos a personas que no tuvieron una participación que lo justifique
- Utilizar la situación de ejercer de juez en la revisión por pares (como por ejemplo: otorgamiento de fondos para investigación, informes de avance, informes de becas, aprobación de trabajos para publicar) para sacar ventajas.

- Participar en experimentos que conduzcan a la obtención de armas de guerra de cualquier naturaleza (químicas, atómicas, biológicas)
- Bioética (Debido a que este es un curso de iniciación a la investigación nosotros no vamos a tratar el tema de la bioética relacionado con el ejercicio de la medicina, así como con las manipulaciones de embriones, clonación y otros).

Fraude

El diccionario de la Real Academia Española define el **fraude** como una acción contraria a la verdad y a la rectitud, que perjudica a la persona contra quien se comete. En última instancia, el fraude no sólo perjudica a terceros sino que también perjudica a uno mismo, ya que la palabra del investigador, una vez descubierto el fraude, perderá credibilidad para siempre.

¿Podríamos considerar que, al igual que las mentiras, hay fraudes banales y otros que no lo son? Cometer fraude con los resultados de la experimentación, por más que se trate de falsificaciones inocentes, es crear un hábito de trabajo reñido con la conducta que le cabe a un investigador. Analizaremos diferentes situaciones de fraude según su gravedad.

Creación o invención de datos

Existen numerosos casos de fraudes de esta naturaleza en la historia de la ciencia, cometidos, algunos de ellos, para nuestra incredulidad, por científicos que por sus investigaciones ya habían recibido el premio Nobel. Este tipo de fraude es el más grave. Existe una larga lista que documenta estos fraudes que ya son históricos y que pueden consultarse, por ejemplo, en la Wikipedia. La falsificación de datos por parte de un laboratorio prestigioso puede mantenerse en la impunidad por un tiempo, precisamente porque pocos investigadores se atreven a discutir la palabra de los “popes” de la ciencia. En ese sentido hay científicos idolatrados como hay actores, escritores o líderes políticos admirados cuya palabra se fortalece por el pedestal en que lo ubica la sociedad. Sin embargo, una de las reglas fundamentales que forman parte del entramado científico es que los resultados experimentales que se publican y dan a conocer a los especialistas puedan ser reproducidos en cualquier laboratorio del mundo. Por esta razón ¿cuánto tiempo transcurrirá hasta que se descubra un fraude? Dependerá del tipo de fraude y de su importancia, es decir, de la magnitud del hallazgo proclamado. Cuando en diferentes laboratorios del mundo se inicie una investigación basada en la teoría proclamada (falsificada), y los investigadores no puedan comprobarla y se acumulen resultados adversos, entonces comenzará la revisión de esa teoría hasta demostrar que fue un fraude.

Dentro del campo de las ciencias experimentales hay un tejido de sustento del sistema científico formado por la interconexión de personas o grupos representados por los organismos de ciencia, todos los laboratorios de los países del mundo con desarrollo científico, los cuerpos colegiados de Sociedades científicas y de las editoriales dedicadas a la ciencia. Esta situación permite que los resultados publicados por un grupo de trabajo sean conocidos, repetidos y analizados por un gran número de investigadores.

¿Cómo se puede cometer un fraude? Los hay sutiles y otros burdos, recuerdo que en mis inicios como investigadora los investigadores rusos realizaban descubrimientos espectaculares dentro del campo de la

Virología que luego nadie podía repetir. También recuerdo el caso de un investigador de Estados Unidos que había demostrado en un experimento genético el nacimiento de un ratón con una mancha negra en su piel que sustentaba una teoría que nadie había demostrado. La revista Science dio publicidad al hallazgo hasta que alguien demostró que el ratón estaba ¡pintado con tinta negra!

Este tipo de fraude se puede cometer fácilmente al día de hoy trucando fotos, eligiendo por ejemplo sólo una parte donde se ve lo que uno pretende demostrar y poniéndole al costado para comparar un control negativo. No olvidemos que el programa del photoshop no sólo le borra las arrugas a las estrellas de cine, también borra todo lo que no conviene que aparezca.

Fraudes de poca monta, pero fraudes al fin

Quizás podríamos considerar que correr el valor de un punto en un conjunto de puntos para que la curva resultante sea más elegante, no sea un fraude de la misma magnitud que decir que se tiene un resultado positivo de algo que no dio. Hay que acostumbrarse a que los experimentos no responda en forma matemática, sobre todo si son de naturaleza biológica. Siempre tenemos opciones antes de “dibujar” un dato. Podemos repetir el experimento y efectuar un promedio estadístico graficando los errores en cada punto, y la curva resultante será más aproximada a la realidad.

Muchos investigadores omiten publicar los resultados no favorables a su hipótesis. Pongamos por caso que un experimento se repite tres veces y solo una vez se tuvo el resultado esperado. ¡El investigador publica este resultado! ¿Cómo calificaríamos esta acción? ¿Es una falsificación o una manipulación? cualquiera sea la denominación que le otorguemos, es una actitud incorrecta.

Hay investigadores notables que consideran que la práctica de mala ciencia o pseudociencia es un caso de fraude, entendiendo por mala ciencia la que se realiza con técnicas no apropiadas o aquella que carece de interés o cuyos resultados son mal interpretados.

Plagio (copiar en lo sustancial obras de otro dándolas por propias)

En la ciencia, al igual que en la literatura, la música y otras artes creativas, se observan a menudo casos de plagio. Es muy común que en algunos trabajos científicos aparezca la siguiente frase: “esta es la primera vez que se describe...”, algunos suavizan la oración de esta forma: “según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se demuestra...”. Pero muchas veces la idea la exploraron otros anteriormente. Veamos algunos ejemplos que son producto de la experiencia acumulada a lo largo de los años.

Caso 1 Se envía a publicar un trabajo a una revista considerada de primer nivel, y el trabajo luego es enviado para que sea juzgado por un árbitro que conoce el tema. Pero puede ocurrir que trabaje en el tema y vaya más atrasado en los resultados, entonces, con excusas tontas, retiene la publicación del trabajo hasta que termina su propio trabajo, que sale publicado primero. Luego el editor que difunde los intereses de grupo finalmente decide rechazar el trabajo que le fue enviado para publicar.

Caso 2. Los resultados de un trabajo se publican en una revista escrita en otro idioma que no es inglés o que tiene menor difusión. Los investigadores “de nivel” no pueden perder el tiempo mirando la bibliografía, ignoran ese trabajo y se adjudican la autoría del mismo hallazgo.

Caso 3. Un investigador ocupa una posición que le permite acceder a la información presentada en informes o pedidos de subsidio, toma la idea del proyecto y avanza en él hasta competir por la primacía o por lo menos la aparición simultánea de los datos.

Caso 4. Un investigador se plagia a sí mismo repitiendo sus resultados armados de otro modo y enviándolos a distintas revistas científicas. De esta forma logra sumar antecedentes.

Estimados lectores, sólo quiero agregar que tengo bien documentados todos estos casos, no son productos imaginarios.

Otras faltas de conducta

Cuando se publica un trabajo de investigación, se debe incluir como parte del trabajo citas bibliográficas pertinentes, esto quiere decir que se citan trabajos propios y ajenos que hacen al fundamento de las técnicas o contribuyen a confirmar la hipótesis de trabajo. Muchas veces se evita citar los trabajos que prueban lo contrario y se buscan los trabajos coincidentes. En este caso tenemos un ejemplo de falta de conducta por omisión.

Otra clase de conducta no sancionada es la incorrecta asignación de autoría en los trabajos. Este no es un tema menor, ya que el ascenso en una carrera como investigador está relacionado con el orden en que se firman los trabajos. Otorga más puntos firmar primero que en el medio de varios autores, al respecto se pueden mostrar varios ejemplos. No es nuestra intención agotar el tema, pero se registran casos extremos, como aquellos en que los estudiantes son incluidos en los trabajos aunque no hayan puesto su intelecto en él sino colaborado manualmente. El motivo que da lugar a esta situación es muy simple, crear un currículum abultado a un joven para que luego pueda ganar las postulaciones a becas permitiendo al director conseguir mano de obra rentada. El otro extremo es no incluir, con diferentes excusas, a personas que trabajaron activamente en el proyecto, y ponerlas en el apartado de los agradecimientos. Esto se hace para evitar el número excesivo de autores en un trabajo. Cualquiera sea la motivación que se invoque, ambas situaciones son repudiables y se debe tender a establecer una autoría justa, ni regalando ni quitando.

Motivaciones.

Una de las razones fundamentales que pueden explicar, pero no justificar, la falta de conducta adecuada es la necesidad imperiosa de publicar trabajos de investigación que tiene un científico para mantenerse en carrera. Plagiando la frase de otra persona: “publicar o perecer” creemos que representa la forma sintética que muestra las reglas que rigen dentro del entramado de la comunidad científica.

Graves conflictos de interés

Citaremos algunos ejemplos que son difíciles de compatibilizar con conductas éticas transparentes. No se trata de situaciones planteadas desde la teoría, son situaciones reales que se le pueden presentar a cualquier investigador.

-El primer caso que se me ocurre está relacionado con la actitud de un investigador que trabaja en una industria farmacéutica y mantiene el secreto sobre los efectos secundarios negativos de una droga, presionado o no por la empresa. ¿Cómo resolverá el dilema de conciencia que se le plantea? Puede que parezca fácil juzgarlo pero no lo es.

-Cuando un investigador entra a trabajar en una dependencia del ejército dedicada al desarrollo de armas biológicas o químicas ¿creerá sinceramente que serán usadas para mantener la paz?

Experimentos realizados con seres humanos y con animales

Hombres. Los protocolos de experimentación de drogas o pruebas de vacunas en humanos responden a una serie de reglamentaciones que se han ido perfeccionando con el tiempo. Requieren generalmente la aprobación de un comité de ética que estudia los distintos aspectos a tener en cuenta. Siempre requieren del consentimiento por escrito de los voluntarios y para que tengan validez los resultados se deben cumplir diferentes etapas que ya son clásicas.

Pero lo que causa más problema de conciencia, e mi opinión personal, es saber que para que los resultados sean válidos algunos recibirán placebo (o sea nada) y los otros la droga que se supone cura o la vacuna que protege.

Animales. Se han cometido muchas atrocidades con los animales de experimentación, hasta que finalmente se ha impuesto la convicción de que el trabajo con los animales que esté justificado debe realizarse de acuerdo con normas establecidas universales. En algunas Universidades los protocolos que utilizan animales son rigurosamente estudiados por Comités formados a tal efecto, pero no en todas partes se aplican las reglas consensuadas. Con el tiempo los monos han sido casi exterminados. En una humanidad donde el hombre mata a otro hombre porque es de diferente color o cultura, no es de extrañar que los animales mueran para convertirse en alimento, por pura diversión, por contrabando y en manos de algunos científicos que los usan sin debida razón..

Referencias

- Celia E. Coto y Mercedes C. Weissenbacher Aspectos éticos que plantea la investigación biomédica básica. 1996 Cuadernos del Programa Regional de Bioética OPS-OMS, vol 3: 107-119,.
- David Goodstei. Scientific Misconduct <http://www.aaup.org/publications/Academe/2002/02JF/02jfgoo.htm>
- William Broad & Nicholas Wade, *Betrayers of the Truth*. Oxford University Press, 1982.
- Brock K. Kilbourne and Maria T. Kilbourne, 1983. *The Dark Side of Science*, Proc. of the 63rd Annual Meeting of the Pacific Division, AAAS, April 30,.
- Mario Bunge. Ética, ciencia y técnica. Editorial Sudamericana, 1996. ISBN 950-07-1131-1. 183 páginas.

Capítulo 17

Expresión matemática y estadística de resultados experimentales

por Dra. Celia E. Coto

Introducción

No es nuestra intención asustar al lector con la palabra estadística, porque lo que discutiremos en este capítulo tiene carácter elemental. Por otra parte, los lectores con conocimientos sobre el tema no deben ilusionarse por encontrar soluciones a sus problemas. Más que ofrecer fórmulas pretendemos despertar la reflexión sobre el tratamiento de los resultados obtenidos en el laboratorio, porque no hay que engañarse, la experimentación científica requiere del uso de las matemáticas.

En forma alternada con otros conocimientos hemos ido brindando algunas nociones sobre el tratamiento de datos, en especial en el capítulo 11, en el que se presentaron las distintas formas de visualizar los resultados obtenidos en un trabajo experimental destacando la importancia de la elección de un gráfico para la mejor comprensión de lo que se quiere demostrar. En este capítulo ofreceremos ejemplos del tratamiento de datos y mencionaremos algunos tests estadísticos que por su complejidad deberán ser estudiados en libros o cursos especializados. Afortunadamente, existen programas de computación accesibles que permiten realizar, en forma fácil, gráficos y tratamientos de datos. Sin embargo, lo indispensable es saber qué y por qué se pide un cálculo determinado.

Números logarítmicos

Para expresar muchos de los resultados experimentales hay que recurrir a los números logarítmicos. Algunos fruncirán el ceño, pero pensemos que John Napier, un matemático escocés rebautizado Neper, los inventó en 1614. ¿Cómo nos vamos asustar de algo que se conoce desde hace casi 400 años? La idea de Neper fue reducir tanto las multiplicaciones como las divisiones a simples sumas y restas. Para ello asoció a cada número «X» su «logaritmo» ($\log X$). La relación entre ambos verifica que: **a)** el logaritmo del producto de dos números «X» e «Y» es la suma de sus logaritmos. **b)** el logaritmo del cociente de dos números «X» e «Y» es la resta de sus logaritmos. El logaritmo natural de Neper es el cálculo inverso del exponencial.

Definición: *El logaritmo en base a de un número n, es otro número b, tal que cumple esta ecuación:*

$$a^b = n$$

Veamos un ejemplo fácil: si tenemos que $n=100$ y la base del log es 10, entonces el \log_{10} de 100 es 2, porque 10^2 (10×10) es 100, puesto en ecuación será: $\log_{10} 100 = 2$, y para volver a pasar al número natural será el antilogaritmo de 2 es 100. La base más generalizada en el cálculo de los logaritmos es 10 ó base decimal. Sin embargo, en el análisis matemático es muy importante el cálculo con base 'e' = 2,71828...'. Los logaritmos cuya base es el número 'e' reciben el nombre de 'logaritmos neperianos' en

consideración a Neper. Se denotan con el símbolo ' \ln '. Existían antes de los programas de computación tablas impresas en las que estaban tabulados los números y sus logaritmos correspondientes y también el papel semilogarítmico en el que una escala es decimal y la otra logarítmica. Recuerden que una vez que han usado el logaritmo de un número pueden volver al número natural buscando el antilogaritmo.

En la ciencia experimental se aplican los logaritmos en distintas situaciones, una de ellas es cuando se analizan los resultados de un experimento en el que se trabaja con diluciones seriadas. Las más comunes son las diluciones en base 10, pero en serología, por ejemplo, se usan las diluciones en base 2. Cuando una sustancia se diluye en forma seriada de modo de obtener diluciones de la misma de 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10.000 y 1/100.000, son las potencias de 10^n . Si fueran diluciones en base dos, tendríamos 1/2; 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y así utilizando las potencias de 2^n .

Diferencias entre la escala decimal y la escala logarítmica

Cuando representamos en un gráfico los datos obtenidos en un experimento en el que se utilizaron diluciones al décimo, en una de las escalas se representarán dichas diluciones o su inversa (concentraciones) y en la otra los valores que se obtuvieron para cada dilución. Si las divisiones de la escala son 0, 1, 10, 100, 1000, 10.000 y 100.000, tenemos que tener en cuenta que no es posible dividir en segmentos iguales. Así por ejemplo, tendremos una escala que va de 0 a 1; 1 a 10; 10 a 100; 100 a 1000; 1000 a 10.000 y 10.000 a 100.000. Si bien es posible que las divisiones mayores se numeren de esa forma, los intervalos que indican no pueden ser subdivididos a su vez en diez partes por la sencilla razón de que cada intervalo tendrá distintos valores. Si bien la diferencia resulta obvia, quizás sea mejor explicarla, así cada división del intervalo de 1 a 10 valdrá 1; pero cada división entre 10 y 100 valdrá 10 y, en cambio, cada división entre 10.000 y 100.000 valdrá 10.000, con lo que la graficación de los valores intermedios es incorrecta, salvo para los valores que coinciden con las divisiones mayores. Por eso, en estos casos es necesario utilizar logaritmos de modo que ahora las divisiones mayores de la escala quedarán en 0, 1, 2, 3, 4 y 5, que son los logaritmos respectivos de la serie de potencias de 10^n y dentro de cada intervalo en lugar de una escala lineal tendremos una escala logarítmica. Cada intervalo está también dividido en 10 partes, pero no son iguales, como se puede observar en la tabla de logaritmos que se puede consultar en el apéndice de este capítulo. Estas explicaciones parecen muy elementales, pero en mi experiencia como científica me he encontrado en muchas oportunidades con representaciones equivocadas o que algunos estudiantes no sabían el porqué del uso de los números logarítmicos, indispensables cuando se manejan números muy grandes.

Variables

Se puede decir que **variables** son propiedades físicas o químicas que pueden ser medidas, controladas y manipuladas durante un proceso de investigación. Toda investigación empírica se puede inscribir dentro de dos categorías: la de correlación y la de experimentación. Cuando se practica investigación de correlación, se mide por ejemplo la relación entre la concentración de colesterol en sangre

y la presión arterial (es un ejemplo cualquiera), es decir, se eligen dos variables y se las relaciona sin modificarlas. En este caso no podemos decir que una dependa de la otra. En cambio, en la investigación experimental, se eligen variables, se las modifica y se observa el efecto que tiene su modificación sobre otras variables. Es el principio de la causalidad, es decir, la relación causa-efecto se basa en la relación del efecto que los cambios en una variable tienen sobre una determinada propiedad. Las variables pueden ser de tiempo, temperatura, presión, concentración de una sustancia y otras. Las aplicaciones son muy numerosas y son la base de la experimentación científica.

En el campo de la experimentación podemos asegurar que si cada vez que cambiamos la variable A cambia la B, ambas están relacionadas. En consecuencia, también se podría decir que los cambios de A causan los cambios de B. Veamos ejemplos: a temperatura ambiente el agua es líquida, a 0° C es sólida, y a 100° C se convierte en vapor. Es fácil concluir que el estado del agua depende de la temperatura a la que esté sometida. Si se tiene un líquido que contiene 10.000 bacterias, se lo calienta a 50° C por 10, 20 y 60 minutos, luego se cuenta el número de bacterias después de cada período de calentamiento y se encuentran los valores: 500, 50 y 5 bacterias respectivamente, es válido pensar que la efectividad del calentamiento a 50° C para matar las bacterias depende del tiempo de calentamiento.

Conjunto de datos. Población

Cuando se dispone de un conjunto de datos se pueden realizar algunos cálculos matemáticos sencillos que ayudan a su análisis y sirven, en especial, para fines comparativos con otros grupos de datos de similar origen. El tratamiento de datos en la investigación experimental varía según la clase de experimento en cuestión, lo principal es poder tener confianza en los resultados obtenidos y para ello muchas veces es necesario recurrir al cálculo estadístico. Así, si encontramos una droga capaz de proteger al 100% de los animales tratados contra una infección y ensayamos otra droga que solo protege al 10% de los animales, la diferencia es tan contundente que únicamente deberemos repetir el experimento en idénticas condiciones por lo menos tres veces para asegurar sin dudas que la primera es mejor que la segunda. Pero a veces los resultados no son tan opuestos y encontramos diferencias del 10% o menos. En ese caso, aunque también tendremos que repetir el experimento para estar seguros, habrá que agregar un cálculo matemático de errores que nos permita conocer el grado de confianza con el que estamos trabajando o, dicho de otro modo, saber si los resultados son significativos o no. Conviene recordar que siempre que se experimenta se cometen errores propios de las técnicas y métodos usados. Por otra parte, cualquier experimento que incluya reacciones químicas o biológicas no siempre se reproduce de la misma forma, ya que, por más que se trate de repetir todo de la misma manera, siempre ocurre un imponderable, por eso suele darse el valor promedio de varios experimentos y los márgenes de error por debajo o por encima del valor hallado.

Medidas aplicables a un conjunto de datos

Dado un conjunto de datos y en especial ante una gran cantidad de datos que se utilizan al realizar un estudio estadístico se hace necesario resumir toda la información en unos pocos datos para ello se pueden calcular las llamadas medidas de posición central y las medidas de no posición central.

Medidas de tendencia central: La tendencia central se refiere al punto medio de una distribución de variables. Las medidas de tendencia central se conocen como medidas de posición.

Media: la media es el punto en una distribución de medidas, alrededor de la cual las desviaciones sumadas son iguales a cero. Es el valor promedio ponderado de una muestra o población. La media es muy sensible a mediciones extremas que no estén balanceadas en ambos lados.

Las medidas de tendencia central comúnmente empleadas son :

- * Media aritmética
- * Media geométrica
- * Mediana
- * Moda (no se discutirá)
- * Media armónica (no se discutirá)

Media aritmética: la media aritmética es el promedio comúnmente más usado, este puede ser simple o ponderado. La media aritmética simple está dada por la fórmula $\sum X/n$ que significa: la suma de todos los valores dividida por el número de datos.

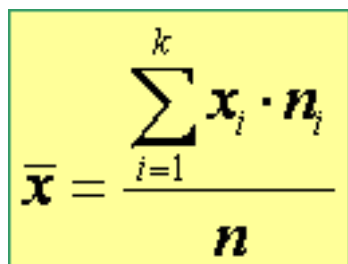
Por ejemplo:

10, 13, 10, 13, 14, 10, 13, 10, 15 la media aritmética es: $108/10= 10,8$

Media aritmética ponderada: se calcula multiplicando cada valor por el número de veces que se repite (frecuencia). La suma de todos estos productos se divide por el total de datos de la muestra:

$$X_m = \frac{(X_1 * n_1) + (X_2 * n_2) + (X_3 * n_3) + \dots + (X_{n-1} * n_{n-1}) + (X_n * n_n)}{n}$$

La expresión matemática general de la media aritmética se expresa así:


$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i \cdot n_i}{n}$$

Siendo x_i el valor de la variable (1,2,3,etc.) y n_i el valor (1,2,3, etc.) de la frecuencia, mientras que n es la suma de las frecuencias absolutas. El signo sigma mayúscula quiere decir sumatoria, los valores extremos de esa sumatoria van desde 1 hasta k . Cada vez que vean una x con un raya arriba es la forma de indicar que se trata de la media, o a veces quiere decir x promedio.

Veamos un ejemplo: se quiere comparar el día de muerte promedio que producen dos toxinas en ratones adultos. Para ello se realiza el siguiente experimento: se dispone de dos grupos de 20 ratones cada uno. El primer grupo se inocula con la toxina A y al segundo grupo con la toxina B, todos los días, por un período de 10 días. Se registra el número de animales muertos, es necesario trabajar en condiciones de una mortalidad del 100% de los animales. Los resultados se tabularon en el cuadro 17.1

El cálculo de la media aritmética presenta el problema de que su valor se puede ver muy influido por valores extremos, que se aparten en exceso del resto de la serie. Estos valores anómalos podrían condicionar en gran medida el valor de la media, perdiendo ésta representatividad. Por esta razón, cada vez que se hace un experimento como el descrito hay, que fijar un intervalo de observación dentro del que se registra la mortalidad. Si por ejemplo dejamos

Cuadro 17.1 comparación del día promedio de muerte entre toxinas A y B

Día de muerte	Toxina A: número de muertos	Toxina B: número de muertos
1	0	0
2	0	0
3	4	0
4	6	3
5	8	4
6	2	6
7	0	4
8	0	3
9	0	0
10	0	0
Total animales muertos	20	20

Cálculo para la toxina A:

$$XmA \text{ (día promedio de muerte)} = (4 \times 3) + (6 \times 4) + (8 \times 5) + (2 \times 6) / 20 = 88 / 20 = 4,4$$

Cálculo para la toxina B:

$$Xm B \text{ (día promedio de muerte)} = (3 \times 4) + (4 \times 5) + (6 \times 6) + (4 \times 7) + (3 \times 8) / 20 = 120 / 20 = 6$$

Podemos concluir que la toxina A es más poderosa que la toxina B porque los animales mueren en promedio más rápidamente: 4,4 días contra 6 días.

los animales en observación por seis meses y entre 20 animales uno muere a ese tiempo la inclusión de ese dato puede distorsionar los resultados si es que sabemos que una droga mata en promedio en cinco días.

Media geométrica: dada una serie n de valores, la media geométrica es la raíz n ésima del producto de todos los valores de la serie. Dicho de otro modo se multiplican entre sí los valores que resultan del producto de la variable por su frecuencia y al producto final se le calcula la raíz n (siendo n el total de datos de la muestra). Según el tipo de datos que se analice será más apropiado utilizar la media aritmética o la media geométrica. Esta última es menos sensible que la media aritmética ante la presencia de valores extremos por su carácter de producto. La media geométrica se suele utilizar en series de datos como tipos de interés anuales, inflación, etc., donde el valor de cada año tiene un efecto multiplicativo sobre el de los años anteriores.

Sean los números 3,4,9 y 12 se necesita calcular la media geométrica, cabe aclarar que como este sistema de cálculo resulta muy difícil de emplear, máxime cuando son números grandes o largas series de datos, en la práctica se recurre a los logaritmos.

Siendo xg (media geométrica) = $\text{antilog} (S \log xi) / n$,

la xg del ejemplo se calcularía así :

$$xg = \text{antilog} (\log 3 + \log 4 + \log 9 + \log 12) / 4$$

$$xg = \text{antilog} (0,477 + 0,602 + 0,954 + 1,079) / 4$$

$$xg = \text{antilog} (3,112 / 4)$$

$$xg = \text{antilog} 0,778$$

si nos fijamos en la tabla de logaritmos del apéndice encontramos que el antilogaritmo de ese número es 6, por lo tanto $xg = 6$.

En el laboratorio de investigación la media geométrica se aplica cuando se desea establecer la concentración inhibitoria 50% de una droga. Por ejemplo, calcular cuántos microgramos de una droga son capaces de inhibir el 50% de una población viral. Ya habíamos visto en capítulos anteriores que el cálculo

de las concentraciones letales o inhibitorias 50% son necesarias a los efectos comparativos de las potencias de drogas u otros productos.

Mediana: La mediana toma en cuenta la posición de los datos y se define como el valor central de una serie de datos o, más específicamente, como un valor tal que no más de la mitad de las observaciones son menores que él y no más de la mitad son mayores. Es decir, la mediana de una serie de datos se sitúa justamente en el centro de la muestra (un 50% de los valores son inferiores y otro 50% son superiores). El valor de la mediana no presenta el problema de estar influido por los valores extremos, pero en cambio no utiliza en su cálculo toda la información de la serie de datos (no pondera cada valor por el número de veces que se ha repetido). Para su cálculo, el primer paso es ordenar los datos de acuerdo con su magnitud, luego se determina el valor central de la serie y esa es la mediana. Si el número de datos es par, existirán dos valores centrales y entonces la mediana se obtiene sacando el promedio de ellos. Por ejemplo : 7, 8, 8, 10, 12, 19, 23 Med = 10 3, 4, 4, 5, 16, 19, 25, 30 Med = $(5+16)/2 = 10,5$

En el gráfico 17.1 hemos representado los datos de un experimento destinado a conocer el efecto antiviral de un producto obtenido de una planta (MA) sobre la encefalitis producida en ratones hembras por inoculación intravaginal del virus herpes simples tipo 2 (HSV-2). Cada punto del gráfico muestra el título (cantidad de virus en el cerebro de los ratones sacrificados al día 10 post-infección, expresado en unidades formadoras de placas por mililitro. Nótese que la escala *y* es logarítmica lo que significa que entre los valores 0-1; 1-2; 2-3; 3-4; y 4-5 no hay una división decimal sino log.

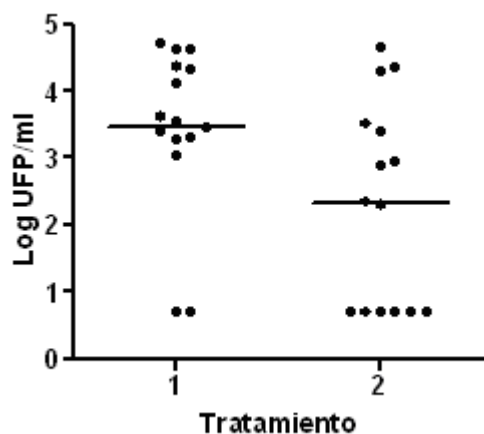


Figura 17.1 Valores de los títulos de HSV-2 en el cerebro de las ratonas sacrificadas a los 10 días post-infección. Tratamiento 1 corresponde al control, animales inoculados sin tratamiento (control); 2 corresponde a los animales inoculados con la misma dosis pero tratados con MA.

Como se puede observar la mediana se muestra como una línea horizontal y nos estaría diciendo que la administración del compuesto hizo descender el título de virus, en promedio, en 1 logaritmo. Desde el punto de vista biológico estos datos indican que la droga tiene un efecto antiviral. Pero a nosotros nos

interesa el tratamiento de los datos, se ve a simple vista que son muy dispersos y muy alejados entre sí lo que impediría otro tipo de representación y el cálculo de la media aritmética o geométrica. Conviene aclarar que cada punto representa el título de virus en el cerebro de un animal (expresado en unidades formadoras de placas), los valores que están por debajo del valor 1 pueden ser valores negativos o no, porque cuando no se encuentran placas utilizando la mayor concentración de virus no se puede decir que no haya virus sino que el número de partículas está por debajo del valor de detección del método.

Histograma.

A diferencia de las medidas de posición central que reflejan el valor promedio de un conjunto de mediciones, un histograma permite observar en forma rápida cómo es una determinada distribución de frecuencias de una variable cuantitativa continua. Habitualmente se representa la frecuencia observada en el eje Y, y la variable, en el eje X. La escala del eje correspondiente a la variable se rotula con los límites inferiores de notación de las clases consideradas, a diferencia de los gráficos de barras que vimos en el capítulo 11, las barras van contiguas y no separadas, por la naturaleza continua de la variable de clasificación. En el gráfico de la figura 17.2 se ha representado un ejemplo imaginario que no tiene que ver con un resultado de laboratorio pero que permite sacar conclusiones rápidamente observando la forma del histograma. Se trata de un estudio sobre las edades de una muestra de 1000 personas que asistieron a un recital de los Rolling Stones. En el eje Y se representa el número de personas y en el X los intervalos de edades considerados.

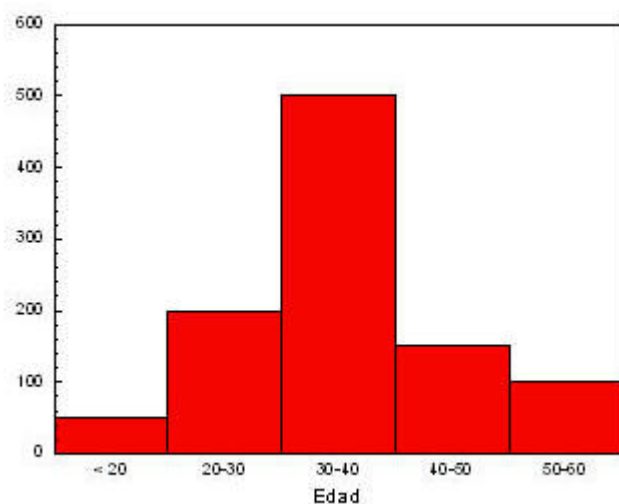


Figura 17.2 Distribución por edades de los asistentes a un recital de rock and roll.

Se puede deducir a simple vista que el 50% de los asistentes al recital tenían entre 30 y 40 años. También se pueden realizar otras deducciones respecto a quienes gustan de este legendario grupo de rock. La

distribución en este caso tiene un aspecto simétrico que se conoce como distribución normal y que en matemáticas se conoce con el nombre de campana de Gauss. Esquemáticamente la figura con forma de campana sería la que muestra la figura 17.3 y es la campana habitual que representa la variabilidad debida a causas aleatorias.

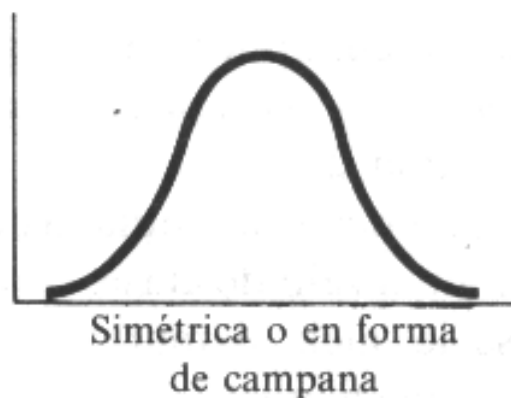


Figura 17.3 curva de frecuencias simétrica de tipo gaussiano.

Medidas de desviación promedio

Las descripciones más comprensivas de la dispersión de datos son aquellas que tratan con la desviación promedio con respecto a alguna medida de tendencia central. Dos de tales medidas son la **varianza** y la **desviación estándar**. Ambas medidas nos dan una distancia promedio de cualquier observación del conjunto de datos con respecto a la media de la distribución.

La **varianza** de una variable aleatoria (azarosa) es una medida de su dispersión estadística, indicativa de cómo sus posibles valores se distribuyen alrededor del valor esperado. La **varianza** representa la media aritmética de las desviaciones de la **media** elevadas al cuadrado. Si atendemos a la colección completa de datos (la población en su totalidad) obtenemos la varianza poblacional y si por el contrario si consideramos sólo a una muestra de la población obtenemos en su lugar la varianza muestral. Las fórmulas de la varianza es:

$$s^2 = \frac{\sum (x - m)^2}{N}$$

s^2 = varianza de la población. x = elemento u observación.

m = media de la población. N = número total de elementos de la población.

Las unidades de la varianza son el *cuadrado de las unidades de los datos*. Estas unidades no son intuitivamente claras o fáciles de interpretar. Por esta razón, hay que hacer un cambio matemático aplicado a la varianza para calcular una medida útil de la desviación, que sea menos confusa. Esta medida se conoce como la **desviación estándar**, y es la raíz cuadrada de la varianza. La desviación estándar, entonces, está en las mismas unidades que los datos originales.

Desviación estándar (El término *desviación estándar* fue incorporado a la estadística por Karl Pearson en 1894).

Una vez entendida la formulación de la varianza podemos pasar a obtener la desviación estándar, tomando la raíz cuadrada positiva de la **varianza**. Así, si efectuamos la raíz de la varianza muestral obtenemos la desviación típica muestral y si por el contrario efectuamos la raíz sobre la varianza poblacional obtendremos la desviación típica poblacional.

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{m})^2}{N}$$

La raíz cuadrada de un número positivo puede ser tanto positiva como negativa. Cuando tomamos la raíz cuadrada de la varianza para calcular la desviación estándar, los estadísticos solamente consideran la raíz cuadrada positiva.

Usos de la desviación estándar

La desviación estándar nos permite determinar, con un buen grado de precisión, dónde están localizados los valores de una distribución de frecuencias con relación a la media. El teorema de Chebyshev (Pafinity L. Chebyshev matemático ruso 1821-1894) dice que no importa qué forma tenga la distribución (véase la figura 17.3 y consultar bibliografía para ver otro tipo de formas de distribuciones que son asimétricas), al menos 75% de los valores caen dentro de ± 2 desviaciones estándar a partir de la media de la distribución, y al menos 89% de los valores caen dentro de ± 3 desviaciones estándar a partir de la media.

Dicho de otro modo:

• Aproximadamente el 68% de los valores de la población cae dentro de ± 1 desviación estándar a partir de la media.

• Aproximadamente el 95% de los valores estará dentro de ± 2 desviaciones estándar a partir de la media.

â Aproximadamente 99% de los valores estará en el intervalo que va desde tres desviaciones estándar por debajo de la media hasta tres desviaciones estándar por arriba de la media.

Ejemplo del uso de la desviación estándar para representar resultados experimentales

El experimento consistió en determinar si en presencia de dos concentraciones distintas de la droga vanadato de sodio, se revertía el efecto inhibitor sobre la replicación del virus de la estomatitis vesicular (VSV) de un compuesto de origen vegetal (MAS).

Para conocer la respuesta, se realizó un experimento con monocapas de células de riñón de mono que se infectaron con virus VSV en presencia o ausencia de las droga y de diferentes concentraciones del antiviral MAS. Luego se determinó la presencia de virus en cada cultivo después de 24 horas de incubación, titulando los sobrenadantes (el líquido que recubre a las células) para determinar la cantidad de virus presente. Para ello se realizaron a partir de un pequeño volumen de líquido (0,2 mL) diluciones sucesivas al décimo en medio de cultivo (ver primera parte de este capítulo) y luego se plaquearon sobre monocapas nuevas. ***Ver al final del capítulo una fotografía de placas de virus.** Al cabo de dos días se revelaron y contaron las placas y se calculó la cantidad de virus presente teniendo en cuenta el volumen utilizado y la dilución donde se contaron las placas. Se asume que cada placa fue producida por una partícula de virus, es decir, una unidad formadora de placa (UFP). De esta manera se pudo construir un gráfico como el de la figura 17.4. ¿Cómo se construyó el gráfico? En principio utilizando un programa de la computadora, pero ¿qué datos se le suministró al programa? Cada punto dibujado en el gráfico resultó del promedio de tres lecturas y las barras de error, hacia arriba y abajo del punto es el resultado de sumar o restar **s** al promedio, es decir el valor promedio $\pm s$. De no dibujarse esas barras de error, la interpretación de los resultados cambiaría. El gráfico muestra que la inactivación del virus (caída de UFP) es concentración-dependiente a mayor concentración de MAS menor el número de UFP (línea negra). El agregado de vanadato en concentraciones de 10 mg (línea roja) o de 20 mg (línea verde) no cambia la cinética de inactivación y salvo para el punto de = 0,30 mg de MAS, el resto de los puntos caen dentro de los errores. El último punto no es tampoco significativo porque hay solo una diferencia de 10 placas. De no haber dibujado los errores hubiéramos pensado que la presencia de 10mg de vanadato interfería con la acción antiviral.

Este es un ejemplo aplicado a un experimento virológico, cualquiera sea el tipo de experimento en que realicen un gráfico con sus datos tendrán que tener en cuenta el promedio y la desviación estándar para construir su curvas en forma correcta.

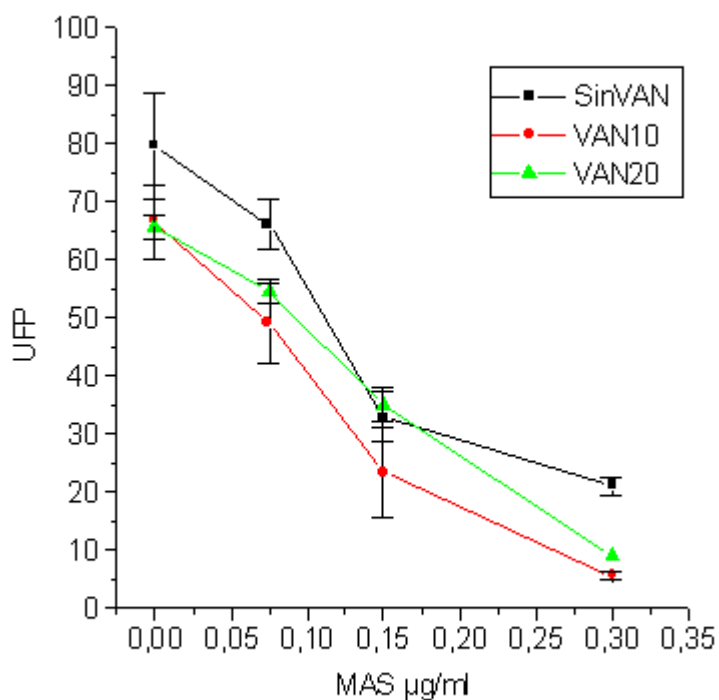


Figura 17.4. Efecto de la presencia del vanadato de sodio sobre la acción antiviral de MAS. Gentileza Dra. Andrea Barquero.

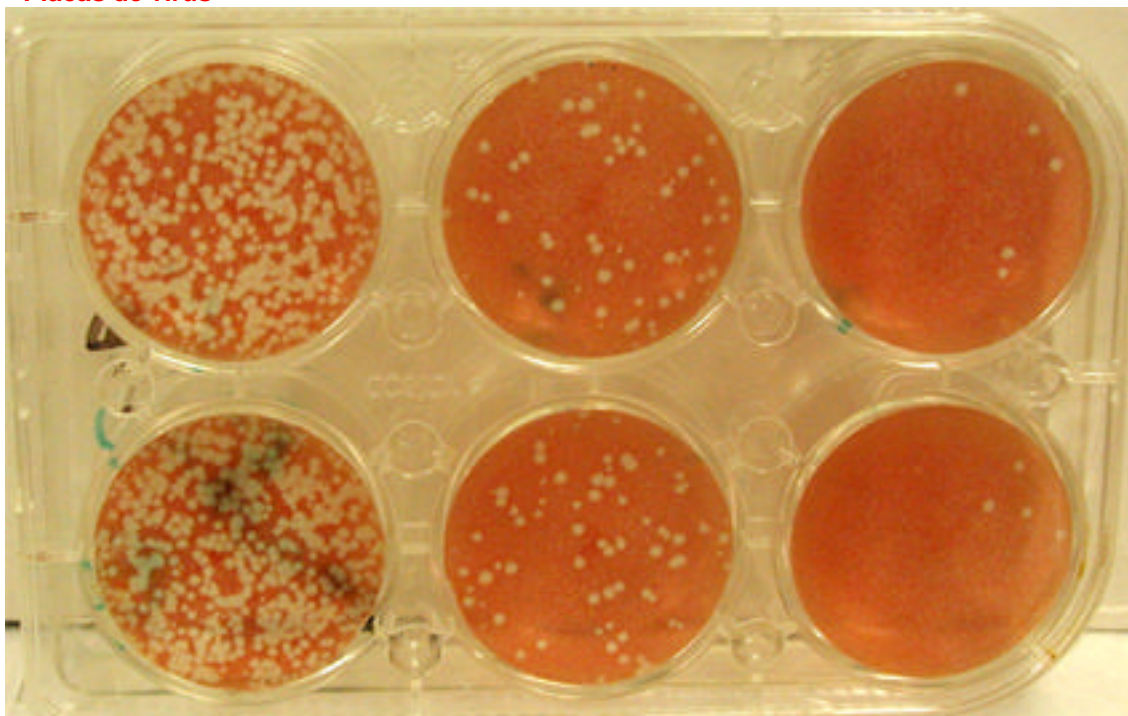
Bibliografía.

<http://www.aulafacil.com/CursoEstadistica/CursoEstadistica.htm>

<http://www.southlink.com.ar/vap/metodologia.htm>

W http://en.wikipedia.org/wiki/Estándar_deviation

* **Placas de virus**



En una microplaca de poliestireno estéril de seis pocillos se siembran células que crecen en monocapas y luego se infectan con virus. Los datos se obtienen por duplicado. En la hilera de la izquierda se sembró la mayor concentración de virus, la segunda y tercera hilera se sembraron con diluciones al décimo seriadas respecto de la primera hilera. Las manchas transparentes indican que las células fueron lisadas (destruidas) por el virus, se ven a simple vista porque la monocapa se tiñó con un colorante, son las unidades formadoras de placas (UFP). A los efectos de calcular el título del virus (se asume que cada placa fue producida por una partícula de virus) se usa la hilera del medio, porque en la primera hay placas que confluyen (se superponen) por lo tanto el contaje es inexacto y en la tercera hay muy pocas placas. Siempre debe haber una relación lineal entre las tres diluciones, así en las placas del medio podemos contar alrededor de 52 placas o sea que en la dilución anterior esperaríamos más de 500 y en la posterior alrededor de 5 que es lo que se ve. Esta fotografía se obtuvo de; <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/replicat.htm>

Apéndice.

Tabla de logaritmos.

Número	Logaritmo	Logaritmo neperiano
1	0,000000	0,000000
2	0,301030	0,693147
3	0,477121	1,098612
4	0,602060	1,386294
5	0,698970	1,609438
6	0,778151	1,791759
7	0,845098	1,945910
8	0,903090	2,079442
9	0,954243	2,197225

10	1,000000	2,302585
11	1,041393	2,397895
12	1,079181	2,484907
13	1,113943	2,564949
14	1,146128	2,639057
15	1,176091	2,708050
16	1,204120	2,772589
17	1,230449	2,833213
18	1,255273	2,890372
19	1,278754	2,944439
20	1,301030	2,995732
21	1,322219	3,044522
22	1,342423	3,091042
23	1,361728	3,135494
24	1,380211	3,178054
25	1,397940	3,218876
26	1,414973	3,258097
27	1,431364	3,295837
28	1,447158	3,332205
29	1,462398	3,367296
30	1,477121	3,401197
31	1,491362	3,433987
32	1,505150	3,465736
33	1,518514	3,496508
34	1,531479	3,526361
35	1,544068	3,555348
36	1,556303	3,583519
37	1,568202	3,610918
38	1,579784	3,637586
39	1,591065	3,663562
40	1,602060	3,688879
41	1,612784	3,713572
42	1,623249	3,737670
43	1,633468	3,761200
44	1,643453	3,784190
45	1,653213	3,806662
46	1,662758	3,828641
47	1,672098	3,850148
48	1,681241	3,871201
49	1,690196	3,891820
50	1,698970	3,912023
51	1,707570	3,931826
52	1,716003	3,951244
53	1,724276	3,970292
54	1,732394	3,988984
55	1,740363	4,007333
56	1,748188	4,025352
57	1,755875	4,043051
58	1,763428	4,060443
59	1,770852	4,077537
60	1,778151	4,094345
61	1,785330	4,110874

62	1,792392	4,127134
63	1,799341	4,143135
64	1,806180	4,158883
65	1,812913	4,174387
66	1,819544	4,189655
67	1,826075	4,204693
68	1,832509	4,219508
69	1,838849	4,234107
70	1,845098	4,248495
71	1,851258	4,262680
72	1,857332	4,276666
73	1,863323	4,290459
74	1,869232	4,304065
75	1,875061	4,317488
76	1,880814	4,330733
77	1,886491	4,343805
78	1,892095	4,356709
79	1,897627	4,369448
80	1,903090	4,382027
81	1,908485	4,394449
82	1,913814	4,406719
83	1,919078	4,418841
84	1,924279	4,430817
85	1,929419	4,442651
86	1,934498	4,454347
87	1,939519	4,465908
88	1,944483	4,477337
89	1,949390	4,488636
90	1,954243	4,499810
91	1,959041	4,510860
92	1,963788	4,521789
93	1,968483	4,532599
94	1,973128	4,543295
95	1,977724	4,553877
96	1,982271	4,564348
97	1,986772	4,574711
98	1,991226	4,584967
99	1,995635	4,595120
100	2,000000	4,605170

Capítulo 18

Enzimas

Introducción

Si los genes son los patrones absolutos e irremplazables de la vida, las enzimas son los obreros especializados que hacen posible que la vida celular tenga lugar. Las enzimas son proteínas que facilitan las reacciones entre moléculas que pueden reaccionar naturalmente entre sí, pero en presencia de una enzima, la velocidad de la reacción se incrementa de tal modo que ocurre en tiempo de segundos o menos. Las enzimas son catalizadores, es decir, son sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No es que hagan factibles reacciones imposibles, sino que aceleran las que podrían producirse espontáneamente. Ello hace posible que, en condiciones fisiológicas, tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH. La función de las enzimas como participe fundamental en una reacción bioquímica fue conocida en los albores de la bioquímica clásica. En resumen, las enzimas son obreros calificados que unen, cortan, transfieren y/o modifican los grupos químicos participantes de las reacciones bioquímicas vitales para la vida.

En los capítulos 13, 14 y 15 de este curso nos referimos a las enzimas que intervienen en los procesos de síntesis de ADN y otros relacionados, pero no nos detuvimos a explicar con detalle qué son las enzimas. En este capítulo daremos un panorama general de su constitución y funciones y luego nos detendremos en el análisis de cómo si se engaña a una enzima se puede atacar una enfermedad.

¿Qué son las enzimas?

Su nombre proviene del **griego** *énsymo* (dentro de la levadura). Las **enzimas** son catalizadores (aumentan la rapidez) muy potentes y eficaces, químicamente son proteínas. Al igual que los catalizadores metálicos, sólo se requiere una masa pequeña para funcionar, la que se recupera indefinidamente. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, no modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución. Las enzimas son grandes **proteínas** que aceleran las **reacciones químicas**. En su **estructura** globular, se entrelazan y se pliegan mediante una o más cadenas polipeptídicas, que así aportan un pequeño **grupo** de aminoácidos para formar el **sitio activo**, o lugar donde se reconoce el sustrato, y donde se realiza la reacción. Una enzima y un sustrato no llegan a interactuar si sus formas no encajan con exactitud. Algunos fragmentos de **ARN** también tienen capacidad de catalizar reacciones relacionadas con la replicación y maduración de los ácidos nucleicos, dichos fragmentos se denominan **ribozimas**. (1) La figura 18.1 esquematiza los pasos de una reacción enzimática en términos generales.

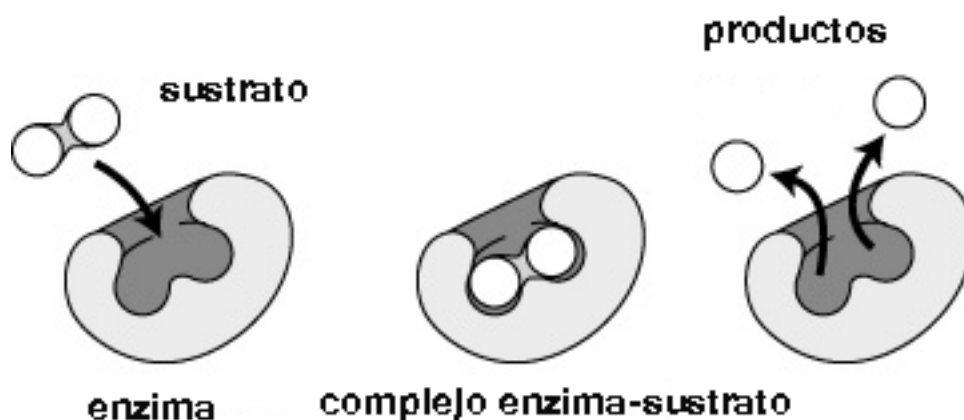


Figura 18.1: Esquematización de una reacción enzimática (tomada de la figura 7 del capítulo 13 de este curso) muestra una reacción enzimática. En el primer dibujo vemos un corte de una enzima que parecería tener forma globular que muestra su sitio activo (señalado con una flecha fina) cuya forma permite la interacción con el **sustrato** que debe ajustarse a la misma geometría. Es como si calzáramos dos bolas en dos hoyos que las contengan. En este caso las dos bolas serían el **sustrato** que será modificado por la enzima, por ejemplo: fosforilado, hidrolizado es decir separado como en el ejemplo, etc. Como resultado final la enzima queda inalterada y sin consumir mientras que el sustrato original desapareció y se convirtió en un producto diferente.

¿Cómo funcionan?

Las enzimas son esenciales para todos los procesos biológicos ya que son las responsables de las reacciones que mantienen la vida. Cualquier mutación o disfunción en un gen responsable de la codificación de una enzima puede causar un enfermedad severa y hasta la muerte.

La acción de las enzimas se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición. El sustrato se une a la enzima a través de numerosas interacciones débiles como ser: puentes de hidrógeno, electrostáticas, hidrófobas, etc, en un lugar específico llamado **el centro activo**. Este centro es una pequeña porción de la enzima, constituido por una serie de aminoácidos que interaccionan con el sustrato. Para ejercer su actividad las enzimas requieren, a menudo, de moléculas auxiliares, que se ubican en el centro activo de la enzima; en el caso de ser moléculas orgánicas reciben el nombre de **coenzimas**, mientras que si son iones metálicos (generalmente **oligoelementos**) se llaman **cofactores** entre los que se encuentran el hierro, cobre, yodo, manganeso, selenio, zinc, cromo, cobalto, flúor, litio y silicio. El conjunto enzima + cofactor o coenzima se denomina **holoenzima**, mientras que la parte proteica propiamente dicha se conoce como **apoenzima**. Usualmente las llamadas coenzimas no son simples moléculas auxiliares de las enzimas sino verdaderos sustratos de las reacciones pero que a diferencia del sustrato principal se regeneran fácilmente mediante reacciones simples.

Las enzimas tienen una estructura tridimensional sin la que no pueden desarrollar su actividad. En esa estructura poseen el [centro activo](#) al que se unen los sustratos y en el que se produce la reacción catalítica. Cuando el sustrato accede al centro activo, se produce un cambio en la estructura del conjunto enzima-sustrato pero una vez finalizada la catalización ([catálisis: transformación química motivada por sustancias que no se alteran en el curso de la reacción](#)) la enzima es recuperada sin ningún cambio en su estructura.

Las enzimas son esenciales para la [vida](#) ya que, de otra forma, las reacciones en las [células](#) ocurrirían lentamente.

Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas

Temperatura: Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, ya que después de aproximadamente 45^o C se comienza a producir la desnaturalización térmica. Las enzimas de muchos mamíferos tienen una temperatura óptima de 37^o C, por encima de esa temperatura comienzan a inactivarse y se destruyen. Sin embargo, existen especies de bacterias y algas que habitan en fuentes de aguas termales y, en el otro extremo, ciertas bacterias árticas tienen temperaturas óptimas cercanas a 0^o C. Un ejemplo interesante lo constituyen las ADN polimerasas aisladas de las bacterias que crecen en aguas termales. Cuando explicamos en el capítulo 15 la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) comentamos que constaba de ciclos de calentamiento y enfriamiento, durante el calentamiento se separaban las hebras de ADN y durante el enfriamiento se volvía a restaurar el dúplex. Lo que hizo posible esta reacción fue el descubrimiento de ADN polimerasas que funcionan a temperaturas altas.

Thermus aquaticus, denominado también *Thermophilus aquaticus*, es una bacteria termófila que vive en la proximidad de las fuentes de agua caliente (de 50 a 80 °C) fue descrito por [Thomas Brock](#) en [1969](#) en una fuente del parque de Yellowstone en Estados Unidos. Es una bacteria gram-negativa ([Gram es una tinción que permite diferenciar las bacterias según el tipo de membrana que las rodea; las gram-positivas se tiñen de violeta y las gram-negativas de rosa](#)), aerobia ([requiere oxígeno](#)) y heterótrofa ([se alimenta de sustancias orgánicas fabricadas por otros organismos](#)). Esta bacteria vive a temperaturas comprendidas entre 50 y 80 °C, debido a que su cóctel enzimático resiste tales condiciones. Normalmente a esas temperaturas, las proteínas constitutivas de la mayoría de los seres vivos se desnaturalizan y no vuelven a ser funcionales. Es por ello por lo que, una de sus enzimas, la [ADN](#) polimerasa de *Thermus aquaticus*, la llamada Taq polimerasa, es ampliamente utilizada por sus propiedades de termorresistencia en las reacciones de PCR. En efecto, esta enzima tiene una temperatura óptima de funcionamiento alrededor de los 75 °C.



Figura 18.2. Microfotografía electrónica de *Thermus aquaticus* (tomada de la Wikipedia en la página dedicada a esta bacteria).

pH (grado de acidez de la solución) El pH no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones (H^+). Los protones además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción. Sabiendo que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH, puede alterar el carácter iónico de los grupos amino (NH_2^-) y carboxilo ($-COOH$) en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación. El pH óptimo de algunas enzimas se muestra a continuación: Pepsina (1,5); Tripsina (7,7); Catalasa (7,6); Arginasa (9,7); Ribonucleasa (7,8)

Clasificación

El Comité de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular clasifica a las enzimas en 6 clases, de acuerdo con del tipo de reacción que catalizan, se muestra en el cuadro 18.1. Se conocen al presente más de 5000 enzimas, algunas trabajan solas y otras necesitan un cofactor. Para medir la velocidad de reacción de una enzima lo que se hace es determinar la velocidad de formación del producto y la cantidad que se obtiene, la actividad se expresa como la cantidad de enzima que produce un mol de producto por minuto de reacción.

Cuadro 18.1 Clasificación de las enzimas según su función

Número	Clasificación	Propiedades bioquímicas
1	Oxidorreductasas	Actúan sobre muchos grupos químicos para agregar o remover átomos de hidrógeno
2	Transferasas	Transfieren grupos funcionales entre moléculas donantes yceptoras. Las quinazas son transferasas especializadas que regulan el metabolismo transfiriendo fosfatos desde el ATP a otras moléculas
3	Hidrolasas	Agregan agua a una ligadura hidrolizándola
4	Liasas	Agregan agua, amoníaco o dióxido de carbono actuando sobre las dobles ligaduras o los remueven para producir enlaces dobles.
5	Isomerasas	Transforman ciertas sustancias en sus isómerass
6	Ligasas	Permiten la unión de dos moléculas con la degradación del ATP que provee la energía necesaria para que la reacción tenga lugar.

Estructura tridimensional de las enzimas

El avance en el conocimiento de la estructura tridimensional de las proteínas surgió mediante la tecnología que comprende primero: la cristalización de las moléculas y luego la determinación del patrón de distribución de sus átomos. Esto se logra cuando un haz de rayos X se hace atravesar el cristal, los rayos son desviados (difractados) al chocar contra los átomos de la red cristalina y se forma sobre una pantalla una figura característica. Por supuesto que sólo los expertos pueden reconstruir la forma de una molécula compleja pero lo hacen con la ayuda de programas de computación que generan estructuras en tres dimensiones. De esta forma se puede establecer cuántos polipéptidos forman la molécula, cuáles son sus plegamientos y localizar además el sitio activo si es que la molécula en cuestión es una enzima.

Consideraremos un solo ejemplo por la belleza de su estructura y su importancia vital en la duplicación y transcripción del ADN. La enzima ADN girasa o helicasa. Como ustedes recordarán de capítulos anteriores (capítulo 13) ambas hebras de un ADN se encuentran enlazadas formando una hélice. En los momentos en que se necesita copiar una de ellas, el ADN se va desenrollando por sectores, este trabajo que requiere de una máquina muy especial es la enzima ADN girasa o helicasa. La estructura de la helicasa se describió recién en 1999 y resultó ser una molécula compleja formada por seis polipéptidos individuales acomodados formando un anillo tal como se ve en la figura 18.2.

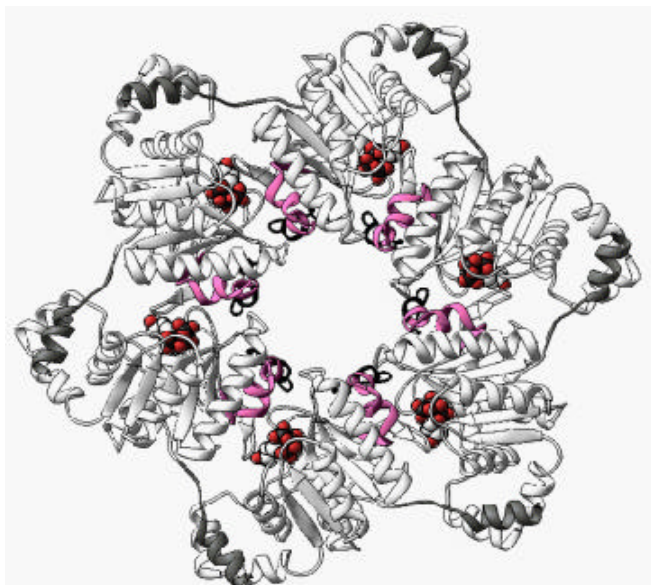


Figura 18.2 Estructura de la helicasa, se trata de una molécula compleja formada por seis helicasas individuales ensambladas de tal modo que conforman un motor en forma de anillo que desenrolla el ADN. El motor se desplaza por el agujero central de una de las hebras y fuerza su paso a través de los pares de bases de la molécula de ADN doble. Las esferas rojas que anidan entre dos lóbulos representan las moléculas de dTTP (deoxitimidina trifosfato) que es la molécula que le provee de energía a la enzima para actuar. Los rulos rosados representan la parte de la molécula que se aferra al ADN. (2)

No todas las helicasas son hexaméricas, hay toda una familia de helicasas de estructuras más simples. A medida que la helicasa avanza a lo largo de la cadena a razón de 300 nucleótidos por segundo va quitándole, mediante hidrólisis, los fosfatos a la molécula de dTTP que es su moneda energética, ya que sabemos que tanto de este nucleótido como del ATP la célula toma energía que le permite llevar a cabo sus reacciones. En la figura 18.3 se muestra la fórmula del dTTP que al hidrolizarse y perder pirofosfato (molécula formada por dos fosfatos) cede energía.

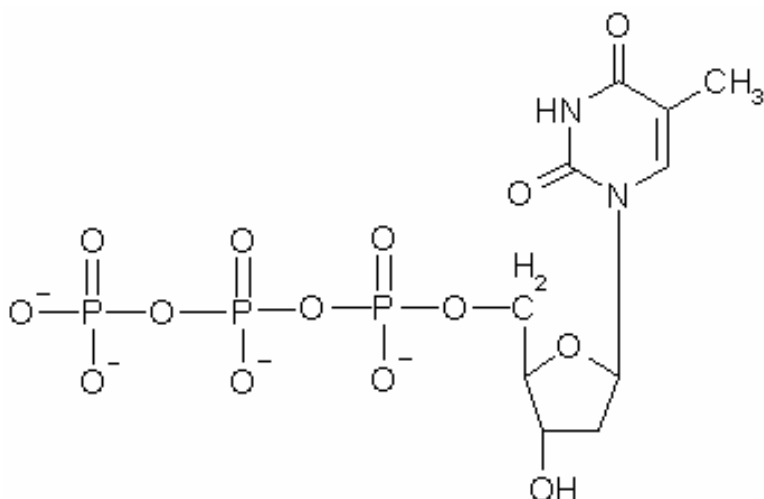


Figura 18.3. Fórmula química del dTTP.

Cómo engañar a una enzima: la base de muchos medicamentos

En una reacción típica catalizada por una enzima tanto la concentración del producto como la del reactivo son cientos de veces o miles de veces más grandes que la concentración de la enzima. La serie de eventos complejos que ocurren en esta reacción son:



Donde ES^* es un estado de transición. La cinética o velocidad de esta reacción bioquímica fue descrita por Michaelis-Menten que la formularon como ecuación y que tiene gran aplicabilidad en todas las reacciones enzimáticas bioquímicas y que permite la graficación y obtención de curvas características. La presencia en la reacción de inhibidores permite determinar en muchos casos el uso de estas sustancias como medicamentos. Para todos los interesados les recomiendo consultar la página:

<http://web.indstate.edu/mwking/home.html> muy completa y actualizada.

Nosotros, en cambio, siguiendo la tónica de nuestro curso y completando los conocimientos impartidos en los capítulos 13, 14 y 15 vamos a ver ejemplos de cómo engañar a una enzima que interviene en la síntesis de ADN virales y de ese modo conseguir moléculas antivirales eficaces. En primer lugar, vamos a analizar la acción de los análogos de nucleósidos sobre las enzimas ADN polimerasa y retrotranscriptasa.

ADN polimerasas

La ADN polimerasa es la enzima principal involucrada en la síntesis de cadenas nuevas de ADN, esencialmente lo que hace es ir enganchando nucleótidos de adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T) unos a continuación de los otros formando una hebra larga y siguiendo el patrón de apareamiento posible que le dicta la secuencia de la cadena molde. Pero el procedimiento no es tan sencillo como lo

mostramos en el capítulo 13 sino que, en realidad, para que se duplique la cadena funcionan al unísono varias enzimas debido a algunas restricciones de la propia polimerasa. Todas las ADN polimerasas conocidas (hay varias) sintetizan el ADN en la dirección 5' a 3' de modo que no puede comenzar a sintetizar desde el extremo, porque sólo puede enganchar en un grupo 3'-OH y por lo tanto necesita de un cebador o *primer* al que pueda enganchar el primer nucleótido. Los cebadores son bases de ARN o ADN que son sintetizados por otra enzima llamada primasa. Recordemos también que, como vimos antes, se necesita una helicasa para que desenrolle las cadenas y ofrezca a la polimerasa una cadena simple para copiar. Las ADN polimerasas son estructuras altamente conservadas lo que significa que sus subunidades catalíticas están altamente conservadas y varían poco de una especie a otra. La ADN polimerasa es una holoenzima ya que requiere ión magnesio como cofactor para funcionar adecuadamente. Algunas polimerasas tienen una función correctora esto significa que si se coloca por error un nucleótido que no corresponde al par, entonces la misma enzima lo remueve. Para ello vuelve hacia atrás un par de bases y con su actividad de exonucleasa 3' a 5' corta (separa el par erróneo) y vuelve a colocar el par correcto y continuando la replicación. Esta actividad se conoce con el nombre de *proofreading* y es equivalente a corregir un texto en la prueba de galera.

Cómo se engaña a una enzima.

Las enzimas no son infalibles, pueden ser engañadas ofreciéndoles sustratos parecidos a su sustrato natural pero que posean algún cambio químico que pueda paralizar la reacción natural. Este es el principio de la obtención de muchos medicamentos contra virus que se conocen con el nombre genérico de antivirales. Así por ejemplo, si queremos combatir la infección con virus Herpes que es un ADN virus que produce esas vesículas molestas en la boca pero también que puede matar por una encefalitis, nosotros podemos evitar que se duplique su ADN dentro de la célula administrando al paciente análogos de nucleósidos. En la figura 18.4 encontramos la fórmula correspondiente a la guanosina (base normal del ADN) y en la figura 18.5 de la acicloguanosina, más conocida como aciclovir- droga efectiva contra el herpes- y del ganciclovir, droga efectiva contra el citomegalovirus (CMV).

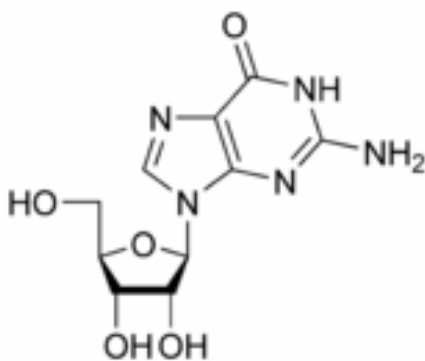


Figura 18.4 Fórmula estructural de la guanosina, resulta de la unión de la base guanina a una ribosa.

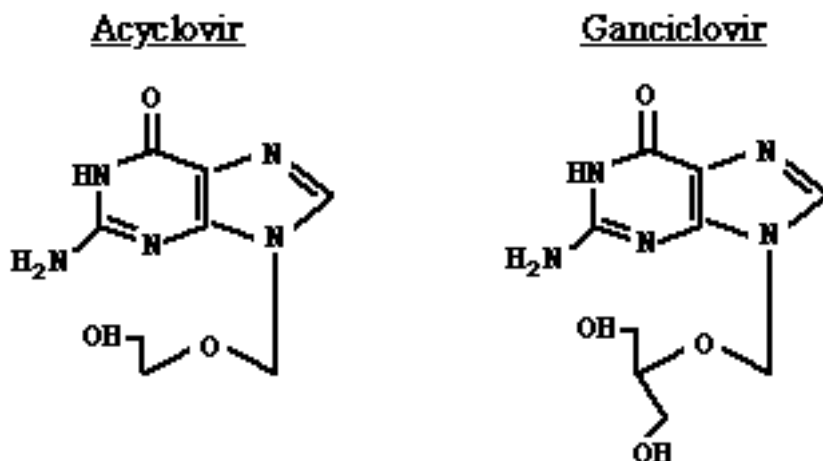


Figura 18.5. Fórmulas estructurales del aciclovir y ganciclovir. Nótese que el anillo de la ribosa está abierto y carece del OH necesario para que se enganche el próximo nucleótido.

Cuando la ADN polimerasa enganche una guanidina en la cadena que se está sintetizando porque tiene que aparearse a una citosina lo hará pero la cadena quedará cortada ya que el próximo nucleótido no tendrá dónde hacerlo, de este modo, la cadena viral no podrá ser sintetizada y no se formarán las partículas virales.

Enzima transcriptasa reversa

Se denomina así a la ADN polimerasa dependiente de ARN, que utiliza al ARN como molde en lugar del ADN. Esta enzima forma parte de los llamados retrovirus entre los que se encuentra el virus causante de SIDA, el virus HIV. Normalmente transcribe la información del ARN y la convierte en un ADN complementario formándose un híbrido ARN-ADN. Luego se digiere el ARN y se duplica la cadena de ADN dando origen a un ADN doble. Como mencionamos en otros capítulos el uso de la palabra reversa se debe a que normalmente en la células el flujo de información es ADN ® ARN ® proteína, en este caso ocurre el proceso reverso ARN ® ADN. Así como se engaña a la ADN polimerasa del virus herpes se puede engañar a la transcriptasa reversa del HIV. Como se puede observar en la figura 18.6 hay moléculas análogas a la timidina, como el conocido AZT y 3 TC que al tener bloqueado el OH de la ribosa al que debe unirse el próximo nucleótido, cortan la cadena creciente de esto modo impiden la replicación viral.

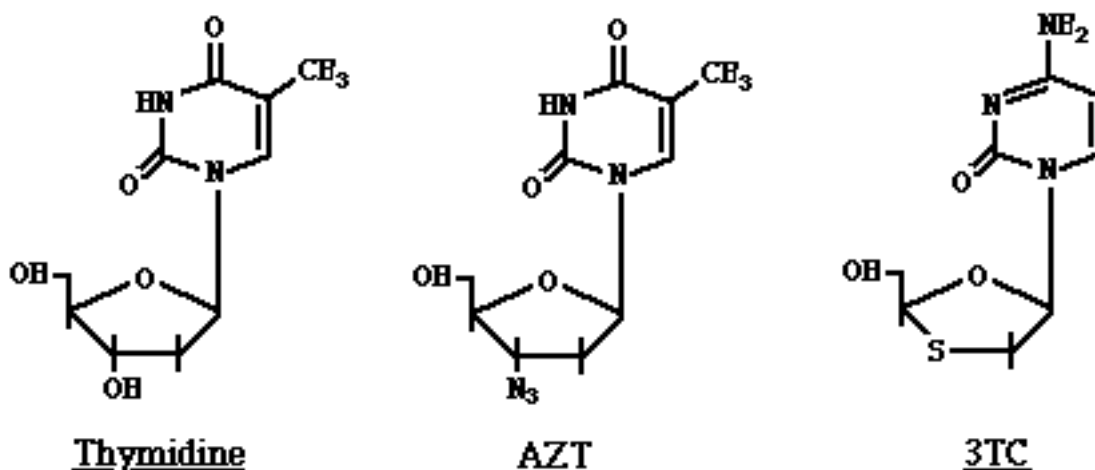


Figura 18.6. Fórmulas estructurales de timidina y análogos de timidina. En el AZT el OH está reemplazado por nitrógeno y en el 3TC por azufre.

Proteasas

Las proteasas (proteinasas, peptidasas, o enzimas proteolíticas) son enzimas que rompen las uniones peptídicas entre los aminoácidos que forman las proteínas. Recordemos que las proteínas son largos polímeros de aminoácidos con muchas funciones dentro de una célula de vital importancia como la digestión, la apoptosis, la coagulación de la sangre y otros. En la figura 18.7 se muestra la síntesis de un péptido (unión de dos aminoácidos) destacándose la unión peptídica.

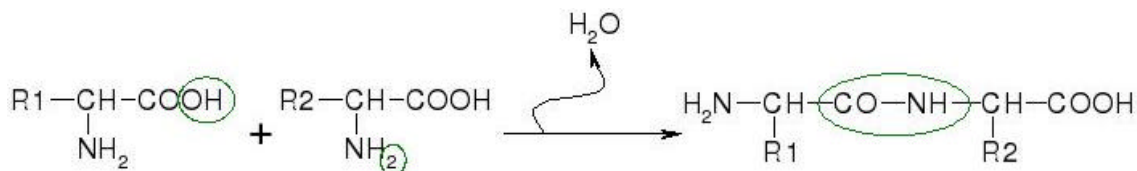


Figura 18.7 Reacción entre dos aminoácidos para dar un péptido. Como resultado de la unión se pierde una molécula de agua.

La acción de estas enzimas consiste en un proceso de ruptura proteolítica en la que usan una molécula de agua de ahí que de acuerdo a la clasificación general se las considere hidrolasas. Las proteasas pueden también servir de blancos para el ataque de microorganismos. Hay numerosas proteasas que cortan las proteínas en determinados aminoácidos, por ejemplo la familia de las caspasas de gran importancia en la apoptosis o muerte celular programada, hidrolizan la unión cuando encuentran en la cadena el aminoácido aspartato. Como esta actividad la realizan por medio de la cisteína se dice que pertenecen al grupo de las cisteín-proteasas. Otras proteasas hacen otro tipo de cortes.

Referencias

Michael W. King, Ph.D / IU School of Medicine / miking at iupui.edu

* Este curso es una contribución de Química Viva educativa (e-Lab) a la propagación del conocimiento científico entre los estudiantes de la escuela secundaria. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.