

MATERIA
Iniciación á Investigación

TITULACIÓN
Grao en Medicina

unidade
didáctica
4

Investigación básica en biomedicina

Helena Covelo Molares

Departamento de Fisioloxía
Facultade de Medicina

unidadesdidácticas
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA





Esta obra atópase baixo unha licenza internacional Creative Commons BY-NC-ND 4.0. Calquera forma de reprodución, distribución, comunicación pública ou transformación desta obra non incluída na licenza Creative Commons BY-NC-ND 4.0 só pode ser realizada coa autorización expresa dos titulares, salvo excepción prevista pola lei. Pode acceder Vde. ao texto completo da licenza nesta ligazón: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.gl>

© Universidade de Santiago de Compostela, 2023

Deseño e maquetación

J. M. Gairí

Edita

Edicións USC

<https://www.usc.gal/publicacions>

DOI

<https://dx.doi.org/10.15304/9788419679666>

MATERIA: Iniciación á investigación

TITULACIÓN: Grao en Medicina

PROGRAMA XERAL DO CURSO

Unidade I. O método científico

Conceptos xerais
Formulación e elaboración de hipóteses
Construción de leis, teorías e modelos

Unidade II. Papel da estatística na investigación biomédica

Análise de resultados
Probos diagnósticas
Introdución ao manexo de programas informáticos de análise de datos

Unidade III. Investigación epidemiolóxica e clínica

Estudos experimentais: concepto e tipos
Estudos observacionais: concepto e tipos
Revisións sistemáticas e meta-análises

Unidade IV. Investigación básica en biomedicina

Modelos experimentais: modelos *in vitro* e modelos animais
Técnicas experimentais básicas en investigación biomédica

Unidade V. Consideracións éticas en investigación biomédica

O consentimento informado
Malas condutas na investigación científica

Unidade VI. Textos científicos

Estrutura dun artigo de investigación biomédica
Como ler un artigo de investigación
A carreira investigadora

ÍNDICE

PRESENTACIÓN

OBJETIVOS E COMPETENCIAS

CONTIDOS

1. Modelos experimentais
2. Modelos experimentais: modelos animais
 - 2.1. Organismos modelo
 - 2.1.1. Organismos modelo unicelulares
 - 2.1.2. Organismos modelo multicelulares
 - 2.1.3. Rato
3. Modelos experimentais: modelos *in vitro*
4. Técnicas para o estudo da dinámica celular
5. Técnicas para amplificación e análises de ácidos nucleicos
6. Técnicas para a detección de proteínas

METODOLOXÍA E ACTIVIDADES PROPOSTAS

AVALIACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

PRESENTACIÓN

A unidade didáctica **Investigación básica en biomedicina** forma parte da materia *Iniciación á investigación* que figura no plan de estudos da titulación de Grao en Medicina pola Universidade de Santiago de Compostela. Esta materia de 3 créditos ECTS impártese no segundo semestre do primeiro curso. O contido dado nesta materia proporciona coñecementos chave para que o alumnado de medicina poida acceder a desenvolver unha carreira investigadora unha vez completada a súa formación. A materia englobase dentro do *Módulo de Medicina Social, Habilidades de Comunicación e Iniciación á Investigación*, xunto con outras materias como *Bioestatística* (primeiro curso), *Ética médica* (segundo curso), *Medicina preventiva e saúde pública* (quinto curso) ou *Medicina legal* (quinto curso).

Esta materia divídese en seis unidades didácticas. A presente céntrase na investigación básica en biomedicina. Nesta parte da materia búscase que o alumnado vexa os diferentes modelos experimentais que se empregan en investigación básica en biomedicina e coñeza as principais técnicas que se empregan neste tipo de estudos. Esta unidade didáctica (IV), xunto coa unidade didáctica Investigación epidemiolóxica e clínica (III), busca que o alumnado coñeza as ferramentas empregadas en distintos campos da investigación en medicina. Estas unidades didácticas (III e IV) precisan das sesións previas nas que se presenta ao estudantado o método científico (I) e as técnicas estatísticas empregadas en investigación, así como o manexo de programas informáticos para o tratamento de datos de investigación (II). Nas seguintes unidades didácticas trátanse as consideracións éticas deste tipo de estudos (V) así como a estrutura dos artigos científicos como ferramentas de difusión dos resultados de investigación (VI). A materia de *Iniciación á Investigación* é fundamental para fomentar as boas prácticas na investigación no ámbito médico e hospitalario e formar o alumnado na correcta interpretación dos resultados científicos.

OBXECTIVOS E COMPETENCIAS

Ao longo desta unidade didáctica traballaranse os **obxectivos xerais** (OX) da materia *Iniciación á investigación* que se especifican a continuación:

- **OX1:** Introducir o alumno na formulación de experimentos, técnicas de investigación biomédica básica e modelos experimentais.
- **OX2:** Transmitir a importancia da investigación básica para o coñecemento das bases da enfermidade e a súa translación á clínica.

De xeito máis concreto, espérase que ao remate desta unidade didáctica o alumnado acade os seguintes **obxectivos específicos** (OE):

- **OE1:** Coñecer os principais animais modelo e modelos *in vitro* empregados en investigación biomédica básica.
- **OE2:** Coñecer os fundamentos básicos das técnicas experimentais máis empregadas na investigación básica en biomedicina.
- **OE3:** Saber escoller un modelo experimental adecuado para responder preguntas biolóxicas concretas para distintos tipos de enfermidades.
- **OE4:** Saber interpretar os resultados obtidos usando as técnicas experimentais de uso máis frecuente en investigación biomédica básica.

Nesta unidade didáctica espérase que o alumnado traballe nas seguintes **competencias** xerais e específicas das recollidas na Memoria do Título do Grao en Medicina da Universidade de Santiago de Compostela:

- **CG34**: Ter, na actividade profesional, un punto de vista crítico, creativo, con escepticismo construtivo e orientado á investigación.
- **CG37**: Adquirir a formación básica para a actividade investigadora.
- **CEMII41**: Coñecer os principios do método científico, a investigación biomédica e o ensaio clínico.
- **CEMII40**: Comprender e interpretar criticamente textos científicos.

CONTIDOS

Nesta unidade didáctica veranse contidos que terán como obxectivo explicar os modelos experimentais e técnicas básicas máis empregados en investigación biomédica. Os contidos serán distribuídos en seis bloques que se detallan a continuación.

1. Modelos experimentais

Neste primeiro bloque introdutorio defínese que é un modelo experimental e mótiase o seu uso como ferramenta de traballo na investigación biomédica sendo un dos elementos centrais do método científico (previamente introducido na UD I).

O método científico pódese definir como unha serie de pasos sistemáticos que nos levan a xerar un coñecemento científico e consta de cinco elementos fundamentais:

- **Pregunta biolóxica**: constitúe o obxectivo do estudo.
- **Hipótese**: será a nosa «tentativa de explicación» do fenómeno de interese observado. Construiremos a nosa hipótese tras unha investigación de fondo do fenómeno de interese.
- **Experimentación**: utilizando un **modelo experimental** que sexa representativo do fenómeno natural realizaremos experimentos para testar a hipótese e xerar os resultados.
- **Avaliación**: interpretación dos datos obtidos e como se adaptan á hipótese proposta. Hai dous escenarios posibles: hipótese certa ou hipótese falsa. En ambos os casos deberemos realizar un informe cos datos obtidos.
- **Revisión**: se a hipótese é rexeitada se reformulará tendo en conta os datos obtidos.

Un dos elementos centrais do método científico é o **modelo experimental**: «sistema simple, accesible e manipulable que permite estudar problemas biolóxicos complexos» (Rosenblueth & Wiener, 1945). Cando empregamos un organismo vivo como modelo experimental este denomínase **organismo modelo**. Os modelos ofrecen simplicidade e reproducibilidade. No caso dos modelos biomédicos, podemos definilos como unha «recreación» dun sistema biolóxico humano que pode ser utilizado para entender funcións fisiolóxicas e/ou patolóxicas.

Pero, por que traballamos con modelos experimentais? Todos os organismos descendemos dunha única célula ancestral (coñecida como *LUCA*), é dicir, todos temos unha orixe común; isto fai que o estudo das células dun organismo teña aplicación directa a outros organismos e xustifica o uso de organismos modelo para o estudo de enfermidades humanas.

Unha vez motivado o uso de modelos experimentais, nos seguintes dous bloques presentarase ao alumnado os dous grandes tipos de modelos experimentais: modelos animais e modelos *in vitro* (do latín: en vidro).

2. Modelos experimentais: modelos animais

Unha vez motivado o uso de modelos en investigación, neste segundo bloque veranse os principais organismos empregados en investigación, con exemplos de achegas científicas que se fixeron empregando distintos organismos modelo.

Os modelos animais pódense definirse como especies animais non-humanas empregadas en investigación biomédica porque poden imitar aspectos dun proceso biolóxico ou unha enfermidade que se atopa nos humanos; con outras palabras: son organismos que ao parecerse o suficiente aos humanos en anatomía, fisioloxía ou resposta a patóxenos, os resultados de estudos en modelos animais pódense extrapolar a humanos.

2.1. Organismos modelo

Todos os organismos empregados como modelo comparten unha serie de características:

- Teñen ciclos de vida curto; chegan á fase madura rapidamente.
- Producen un alto número de descendentes.
- Son facilmente manipulables (isto é, hai ferramentas moleculares e xenéticas para o seu manexo).
- Son baratos e fáciles de manter.
- Teñen un tamaño adulto pequeno.
- Teñen o xenoma secuenciado.
- Deben reflectir o sistema biolóxico que queremos estudar.

2.1.1. Organismos modelo unicelulares

Dentro dos organismos modelo unicelulares veranse as bacterias (*Escherichia coli*) e os fermentos (*Saccharomyces cerevisiae*) como os dous organismos unicelulares máis empregados posto que son sinxelos de propagar e de manipular por enxeñaría xenética. É importante que o alumnado aprenda que as bacterias son empregadas para a produción de plásmidos e que os fermentos son moi empregados para xerar mutantes de xenes de interese e así poder estudar a súa función (técnicas de *xenética inversa*).

2.1.2. Organismos modelo multicelulares

Dentro dos organismos modelos multicelulares, falaremos do verme (*Caenorhabditis elegans*), da mosca da froita (*Drosophila melanogaster*), do peixe cebrá (*Danio rerio*) e do rato (*Mus musculus*). A este último, posto que é un dos organismos máis empregados, se lle dedica unha sección separada.

Para ilustrar o uso destes organismos modelo na investigación en España, presentáranse ao alumnado os datos do uso de distintas especies animais con fins de investigación en España (figura 1):

Figura 1: Datos do número de usos das diferentes especies animais en España nos anos 2019, 2020 e 2021

ESPECIE ANIMAL	2019		2020		2021	
	Número de usos	Porcentaje (%)	Número de usos	Porcentaje (%)	Número de usos	Porcentaje (%)
Ratón (<i>Mus musculus</i>)	460.761	56,35	404.438	55,19	463.290	35,93
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	48.536	5,94	36.741	5,01	44.788	3,47
Cobaya (<i>Cavia porcellus</i>)	8.116	0,99	9.028	1,23	9.058	0,70
Hámsteres (sirios) (<i>Mesocricetus auratus</i>)	848	0,10	713	0,10	1.901	0,15
Jerbos de Mongolia (<i>Meriones unguiculatus</i>)	0	0,00	36	0,00	40	0,00
Otros roedores (otros Rodentia)	1.279	0,16	202	0,03	262	0,02
Conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	20.586	2,52	19.925	2,72	21.253	1,65
Gatos (<i>Felis catus</i>)	542	0,07	779	0,11	741	0,06
Perros (<i>Canis familiaris</i>)	1.463	0,18	789	0,11	1.138	0,09
Hurones (<i>Mustela putorius furo</i>)	96	0,01	109	0,01	125	0,01
Otros carnívoros (otros Carnivora)	5	0,00	48	0,01	36	0,00
Caballos, burros y sus cruces (<i>Equidae</i>)	281	0,03	235	0,03	303	0,02
Cerdos (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	9.410	1,15	8.273	1,13	9.669	0,75
Cabras (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	348	0,04	222	0,03	159	0,01
Ovejas (<i>Ovis aries</i>)	2.261	0,28	1.849	0,25	1.692	0,13
Bovinos (<i>Bos primigenius</i>)	1.155	0,14	2.167	0,30	2.062	0,16
Macacos cangrejeros (<i>Macaca fascicularis</i>)	225	0,03	475	0,06	628	0,05
Macacos Rhesus	1	0,00	0	0,00	1	0,00
Babuinos (<i>Papio ssp</i>)	3	0,00	0	0,00	0	0,00
Otros mamíferos (otros Mammalia)	127	0,02	80	0,01	111	0,01
Aves de corral (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	98.252	12,02	129.142	17,62	108.996	8,45
Pavos (<i>Meleagris gallopavo</i>)					123	0,01
Otras aves (otras Aves)	3.200	0,39	6.259	0,85	3.582	0,28
Reptiles (<i>Reptilia</i>)	979	0,12	240	0,03	1.158	0,09
Ranas Xenopus (<i>Xenopus laevis</i> y <i>Xenopus tropicalis</i>)	401	0,05	596	0,08	354	0,03
Otros anfibios (otros Amphibia)	775	0,09	5.067	0,69	3.123	0,24
Pez cebrá (<i>Danio rerio</i>)	40.493	4,95	36.284	4,95	30.386	2,36
Lubinas (<i>spp. De las familias Serranidae y MORonidae, por ejemplo</i>)	100.843	12,33	68.164	9,30	526.820	40,86
Salmones, truchas, savelinos, timalos (<i>Salmonídeos</i>)					15.411	1,20
Gupis, xiphos y platis (<i>Poecillidae</i>)					0	0,00
Otros peces (otros Pisces)					40.568	3,15
Cefalópodos (<i>Cephalopoda</i>)	16.756	2,05	970	0,13	1.537	0,12
TOTAL	817.742	100,00	732.831	100,00	1.289.315	100,00

Fonte: «Protocolo sobre la protección de los animales durante su transporte: exportación vía aérea por los aeropuertos en España». Catálogo de Publicacións da Administración Xeral do Estado: <https://cpage.mpr.gob.es/>

Para motivar o alumnado e resaltar que o emprego de organismos modelo filoxeneticamente distantes aos seres humanos permitiu achegas científicas moi importantes, falaremos de descubrimentos que se fixeron empregando por exemplo o verme, como o mecanismo da morte celular programa (ou apoptose) ou o ARN de interferencia. Ademais, falaremos de Premios Nobel que recibiron este galardón empregando este pequeno verme como modelo.

2.1.3. Rato

Unha das seccións máis importantes do segundo bloque está dedicada ao rato como organismo modelo. Co rato como exemplo falaremos de modelos inducidos (animais sans nos que as condicións a investigar indúcense de forma experimental), modelos espontáneos (os modelos de enfermidade xéranse de forma natural como consecuencia de variacións xenéticas ou mutacións) e, finalmente, de modelos xerados por modificación xenética (animais transxénicos ou modificados xeneticamente).

2.1.3.1. RATOS MODIFICADOS XENETICAMENTE

Os dous obxectivos fundamentais desta sección son que o alumnado se familiarice coas técnicas dispoñibles para xerar ratos modificados xeneticamente e coa terminoloxía que se emprega para referirse a estes animais (isto é, ratos *knock-out* e ratos *knock-in*). É importante que o alumnado coñeza o fundamento das técnicas de edición de xenes, xa que os modelos animais modificados xeneticamente se empregan decotío na investigación básica.

Falaremos de como podemos empregar o que se coñece como técnicas de xenética inversa para estudar a función dun xene que pode estar mutado nunha enfermidade de orixe xenético. Neste contexto, veranse tres técnicas para a xeración de ratos modificados xeneticamente:

- Mediante microinxección pronuclear. Técnica clásica para a introdución de material xenético en ratos. Foi a técnica empregada para xerar o primeiro rato transxénico, e inda que actualmente está en desuso é importante dende un punto de vista histórico.
- Mediante *gene targeting*. Esta técnica emprega células nai embrionarias e permite unha modificación xenética dirixida do xenoma. Aquí introducíranse conceptos importantes como son os ratos quimera e veremos o proceso de cruzamento de xeracións sucesivas que é necesario para obter os ratos finais modificados que se usan para a experimentación. O alumnado traballará aquí os conceptos de herdanza dominante e recesiva de alelos que se estudan nos cursos de bacharelato.
- Mediante *CRISPR-Cas9*. Esta técnica supuxo unha revolución no campo da edición xénica. Está baseada no sistema de defensa bacteriano de *Streptococcus pyogenes* e ten dous compoñentes principais: un ARN guía (secuencia duns 125 nucleótidos específica para o xene diana a mutar) e a endonuclease Cas9 (xera a rotura da dobre cadea de ADN do xene diana). Poderíamos definilo como unhas «tesoiras xenéticas» programables que poderían cortar calquera secuencia de ADN que desexemos mutar.

3. Modelos experimentais: modelos *in vitro*

Unha vez vistos os modelos animais, pasaremos a ver os modelos *in vitro*, concretamente o cultivo celular e os cultivos celulares tridimensionais (organoides). É importante que o alumnado se familiarice cos distintos tipos de cultivos (primarios, liñas celulares, liñas cancerixenas...) e cos procedementos de mantemento de cultivos (subcultivo, criopreservación, contaxe de células...). Veranse tamén os distintos compoñentes dun cultivo:

- Substrato: a superficie de cultivo.
- Fase gasosa. Conceptos de difusión e de densidade celular.
- Medio de cultivo: requirimentos básicos e suplementos máis comúns (soro, antibióticos...).
- Factores ambientais: pH, temperatura, humidade.

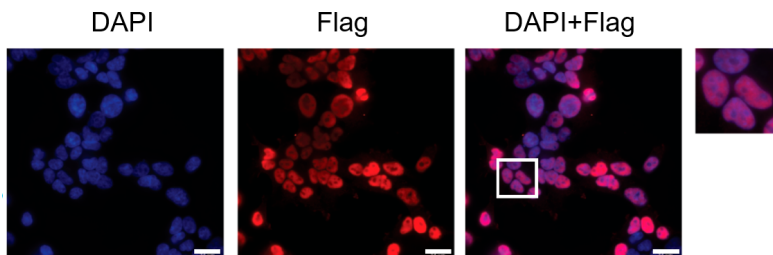
Tamén falaremos do equipamento básico dun laboratorio de cultivo celular (cabins de fluxo laminar, microscopios invertidos con contraste de fases, incubadores...), así como das boas prácticas dun laboratorio de cultivo (técnica aséptica).

4. Técnicas para o estudo da dinámica celular

Neste bloque, xunto cos bloques 5 e 6, falaremos das técnicas máis comunmente empregadas nun laboratorio no que se realice investigación básica en biomedicina. O obxectivo é que o alumnado coñeza o fundamento destas técnicas, sen afondar en detalles técnicos para a realización de cada unha delas.

Neste primeiro bloque falaremos de técnicas para o estudo da dinámica celular, centrándose na microscopia de fluorescencia e na citometría de fluxo. Veranse exemplos de imaxes e gráficas obtidas con estas técnicas, como a que se amosa na figura 2, e traballaremos na interpretación dos resultados obtidos empregando estas técnicas.

Figura 2. Imaxe de microscopia de fluorescencia para o estudo da localización dunha proteína con anticorpos conxugados con marcaxes fluorescentes

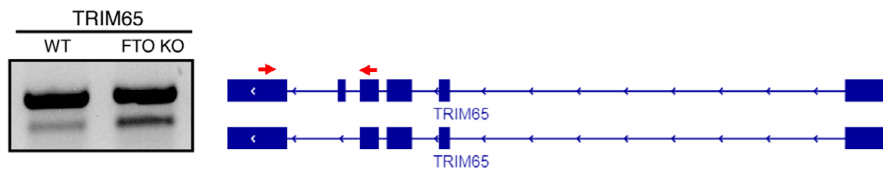


Fonte: elaboración propia.

5. Técnicas para amplificación e análises de ácidos nucleicos

Neste bloque aprofundaremos na técnica da PCR (reacción en cadea da polimerase) e das súas múltiples aplicacións. Falaremos dos distintos tipos de PCR e das súas peculiaridades, como son a PCR a tempo real (qPCR) e a PCR combinada coa transcrición reversa (RT-PCR). Na figura 3 amósase un exemplo dunha imaxe que se pode empregar para ilustrar o uso da técnica de PCR para estudar distintas variantes de ARN dun xene.

Figura 3. Detección de variantes de corte e empalme alternativo mediante a técnica de RT-PCR



Fonte: elaboración propia.

6. Técnicas para a detección de proteínas

Neste último bloque falaremos da técnica máis empregada para a detección de proteínas, o *western blot*. Ademais de ver os fundamentos da técnica, veremos con detalle os pasos a seguir para a preparación de mostras para este tipo de análise, e introduciranse os conceptos de control negativo e control positivo, fundamentais para unha correcta interpretación de resultados.

METODOLOXÍA E ACTIVIDADES PROPOSTAS

A metodoloxía docente prevista nesta unidade didáctica pretende acadar os obxectivos a través da explicación dos seis bloques de contidos e do traballo autónomo pola parte do alumnado. As horas impartidas polo docente dividiránse en clases maxistras (expositivas), sesións de seminarios e titorías personalizadas no caso de ser solicitadas polo alumnado. O número de horas que se debería empregar para cada parte quedaría resumido na Táboa 1.

Táboa 1. Distribución horaria das actividades formativas para a unidade didáctica Investigación básica en biomedicina

Número de horas:	De docencia	De traballo autónomo
Clases maxistrals	4	7
Seminarios	3	5
Titorías	1	

Clases maxistrals (sesións expositivas)

Nestas sesións explicaranse os conceptos teóricos apoiándose en presentacións e no uso do encerado. As diapositivas e material complementario que se poda empregar durante este tipo de docencia facilitaranse o alumnado a través do Campus Virtual da Universidade de Santiago.

Seminarios (sesións interactivas)

Neste tipo de sesións máis interactivas e en grupos reducidos preténdese que o alumnado aplique os conceptos vistos nas clases teóricas a casos prácticos. Para fomentar a participación do alumnado, antes do comezo destas sesións, habilitarase unha **actividade de escolla** no campus virtual para seleccionar de entre varias enfermidades humanas de base xenética, aquela na que se centrarán as sesións de seminarios. Unha vez escollido o tema, facilitarase ao alumnado material de consulta básico previamente ás sesións na aula. Nas clases presenciais, guiarase ao alumnado nos pasos a seguir para escoller o modelo experimental idóneo para o estudo da enfermidade en cuestión e veremos como usariamos a técnica de CRISPR-Cas9 vista nas sesións expositivas para xerar un modelo modificado xeneticamente, así como as técnicas experimentais que poderíamos usar para caracterizar o noso modelo de enfermidade.

Titorías

Neste tipo de docencia potenciarase a implicación do alumnado co obxectivo de realizar un seguimento da aprendizaxe, así como de identificar en que contidos é necesario afondar máis. As titorías poderían ser individuais ou en grupos reducidos, de como moito catro estudantes.

AVALIACIÓN

Os obxectivos específicos desta unidade didáctica serán avaliados do seguinte xeito:

- **[OE1]- [OE2]:** Para avaliar estes obxectivos empregarase principalmente o exame final da materia, no cal se incluírán preguntas de resposta curta e preguntas con múltiples opcións de resposta que permitan avaliar a comprensión dos contidos teóricos por parte do alumnado.

- [OE3]- [OE4]: A avaliación destes obxectivos farase durante as clases de seminarios. Por un lado, terase en conta a participación do alumnado na resolución dos exercicios propostos durante a sesión. Para avaliar este punto, propóranse varias pequenas tarefas ao longo das clases de seminarios para que un alumno ou alumna resolva cada unha delas. Ademais, durante a última sesión de seminario habilitarase un cuestionario a través do campus virtual da Universidade de Santiago no que se avaliará a capacidade dos alumnos para escoller un modelo experimental para unha pregunta biolóxica proposta e que técnicas se deberían empregar para as análises propostos.

BIBLIOGRAFÍA

ALBERTS B; JOHNSON A; LEWIS J; RAFF M. (2007): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing. 5ª ed.

WEINBERG R.A. (2014): *The Biology of Cancer*. Garland Science. 2ª ed.



Unha colección orientada a editar materiais docentes de calidade e pensada para apoiar o traballo do profesorado e do alumnado de todas as materias e titulacións da universidade

unidadesdidácticas
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA