

La Bioquímica y su Estudio

UPV/EHU



LA BIOQUÍMICA Y SU ESTUDIO

Se puede definir la Bioquímica como la **ciencia que estudia los procesos químicos que tienen lugar en los seres vivos**. Los objetivos de la Bioquímica consisten en **estudiar**:

- la **composición** química de los seres vivos (las biomoléculas)
- las **relaciones** que se establecen entre dichos componentes (interacciones)
- sus **transformaciones** en los seres vivos (metabolismo)
- la **regulación** de dichos procesos (fisiología)

El investigador es incapaz de percibir a través de sus sentidos los sucesos que tienen lugar en el interior de un ser vivo. Necesita, por tanto, **utilizar diversos instrumentos y técnicas experimentales** que le permitan estudiar estos procesos. Por este motivo, el desarrollo de la Bioquímica está íntimamente relacionado con los avances tecnológicos.

La Bioquímica es una **ciencia empírica** y, por tanto, su desarrollo está ligado a la observación y a la experimentación. Para generar conocimientos, la Bioquímica utiliza el denominado **método científico**. Según el *Oxford English Dictionary*, el método científico es: «un método o procedimiento que ha caracterizado a la ciencia natural desde el siglo XVII, que consiste en la observación sistemática, medición, experimentación, la formulación, análisis y modificación de las hipótesis.

El método científico está sustentado por dos pilares fundamentales. El primero de ellos es la **reproducibilidad**, es decir, la capacidad de repetir un determinado experimento, en cualquier lugar y por cualquier persona. Este pilar se basa, esencialmente, en la comunicación y publicidad de los resultados obtenidos (por ejemplo, en forma de un artículo científico). El segundo pilar es la **refutabilidad**, es decir, que toda proposición científica tiene que ser susceptible de ser rechazada. Para ello habría que diseñar experimentos, que en el caso de dar resultados distintos a los predichos, negarían la hipótesis puesta a prueba.

En cada rama de la ciencia se aplican versiones distintas del método científico. En Bioquímica, los investigadores utilizan el método **hipotético-deductivo** para hacer de su actividad una práctica científica.



El método hipotético-deductivo consta de varias fases:

- **Planteamiento del problema:** se observa el fenómeno a estudiar y se recopila la mayor cantidad de información posible sobre el tema.
- **Elaboración de una hipótesis** que explique dicho fenómeno.
- **Deducción** de las consecuencias derivadas de dicha hipótesis.
- **Verificación** experimental de los enunciados deducidos.

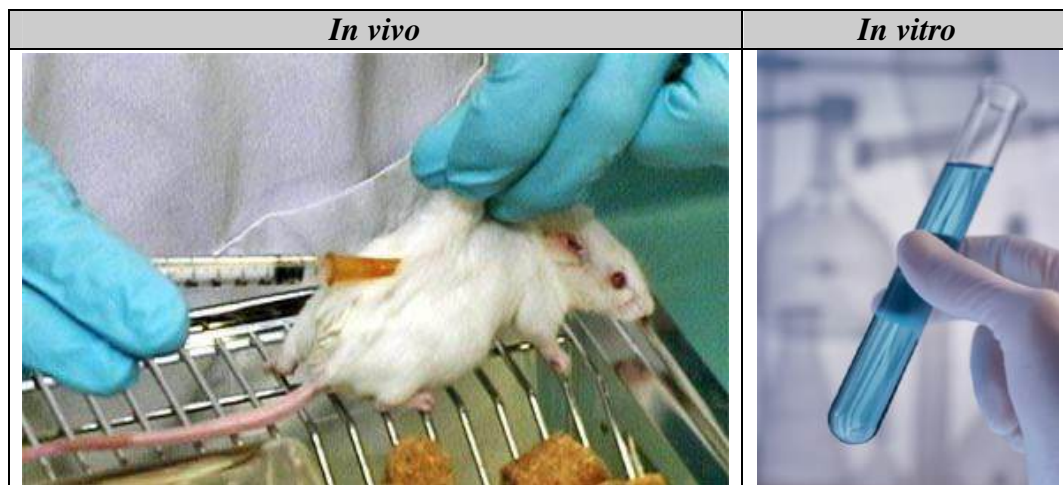
Este método obliga al científico a combinar la **reflexión racional** (elaboración de la hipótesis y deducciones) con **procedimientos empíricos** (observación de la realidad y verificación experimental).

TIPOS DE EXPERIMENTOS QUE SE PUEDEN HACER EN BIOQUÍMICA

Los seres vivos son sistemas complejos en constante estado de cambio y los procesos químicos que tienen lugar en su interior se ven afectados por numerosos factores, en muchos casos, desconocidos. Cuando los bioquímicos realizan un experimento se enfrentan a un dilema: por un lado, intentan hacerlo en **condiciones lo más parecidas posible a la realidad** y, por otro lado, pretenden hacerlo **de forma controlada**. Cumplir ambos objetivos es imposible: para ganar control sobre el sistema, hay que alejarlo de la realidad. Desde este punto de vista, se distinguen cuatro tipos distintos de experimento:

1.- Experimentos *in vivo*

Son aquéllos en los que el sujeto de experimentación es **un ser vivo**. En este caso, las condiciones experimentales son prácticamente **idénticas a las condiciones reales**. Sin embargo, **apenas se tiene control** sobre los parámetros que pueden afectar al sistema y eso limita mucho el tipo de experimentos que se pueden llevar a cabo. La interpretación de los resultados también es más complicada, ya que son muchas las variables que intervienen en el sistema.



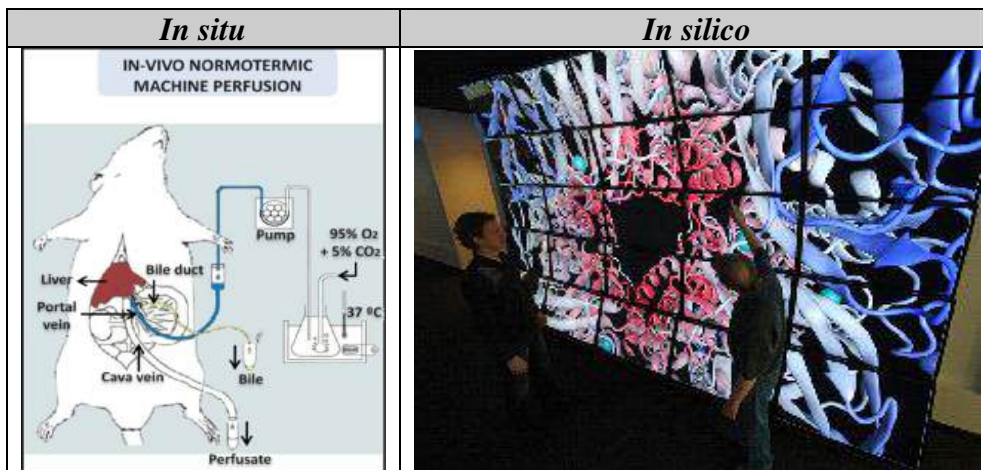
2.- Experimentos *in vitro*

Son aquéllos en los que **sólo se estudia una parte del ser vivo**. Representan una visión reduccionista de la realidad ya que presuponen que "el todo puede ser explicado nada más que con la suma de sus partes constituyentes". En este tipo de experimentos, lo primero que se hace es **aislar (o purificar)** la parte del sistema que se va a estudiar (un órgano, un tejido, un tipo celular, un orgánulo o una biomolécula). En muchos casos es un trabajo largo y tedioso que, sin embargo, hay que hacer con muchísimo cuidado para preservar la integridad estructural y funcional del sistema.

Estos experimentos son los más frecuentes en Bioquímica, ya que tienen la ventaja de que es relativamente sencillo **controlar las variables** que afectan al sistema (pH, temperatura, concentración de determinadas sustancias, etc.) y los resultados se pueden interpretar más fácilmente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el sistema original ha sufrido una perturbación considerable y que **las condiciones experimentales pueden estar muy alejadas de la realidad**. Existe la posibilidad de que los efectos que se observan *in vitro* no se reproduzcan en experimentos *in vivo*. Por tanto, para poder extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a condiciones *in vivo* es necesario hacer numerosos controles experimentales.

3.- Experimentos *in situ*

Representan una **situación intermedia** entre los experimentos *in vivo* y los experimentos *in vitro*. Este tipo de experimentos tienen la ventaja de que las condiciones experimentales **se asemejan mucho a la realidad** y, además, es posible controlar hasta cierto punto las variables que afectan al sistema. Sin embargo, los animales de experimentación sufren una manipulación tan drástica que obliga a sacrificarlos una vez finalizado el experimento.



4.- Experimentos *in silico*

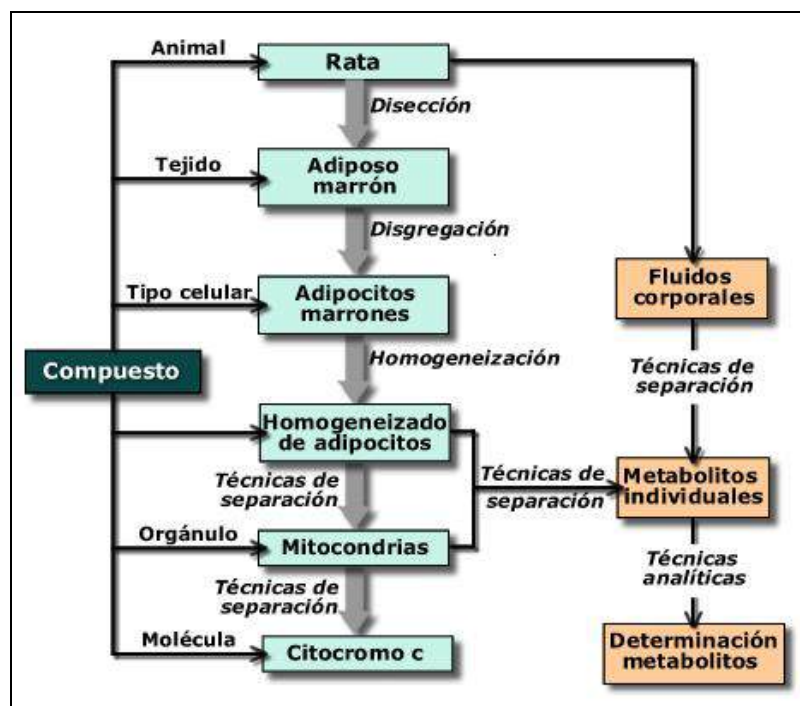
Los **ordenadores** están cada vez más presentes en los laboratorios de bioquímica. Existen numerosos programas que nos permiten analizar con todo detalle la estructura de las biomoléculas, determinar cómo interaccionan entre sí, descubrir posibles ligandos que potencien o inhiban su función, etc. Además, las **técnicas bioinformáticas** nos permiten buscar secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos en las bases de datos y establecer relaciones estructurales, funcionales o evolutivas entre ellas.

Todas estas actividades pueden considerarse como verdaderos experimentos y tienen la ventaja de que no es necesario hacerlos dentro de un laboratorio. En este tipo de experimentos se tiene un **control total sobre la realidad**. La única pega es que se trata de una **realidad virtual** y los resultados proporcionados por el ordenador no dejan de ser simples **modelos o predicciones**. Sólo serán verdaderamente útiles en el caso de que puedan ser **verificados experimentalmente**.

NIVELES DE EXPERIMENTACIÓN EN BIOQUÍMICA

Cada científico está interesado en un problema científico concreto y, para su estudio, utiliza el sistema experimental que considera más adecuado. Este sistema experimental también se denomina **sistema modelo** y a partir de los resultados obtenidos experimentalmente se extraerán conclusiones de carácter más general.

En función de cuál sea el sistema modelo utilizado, se distinguen **distintos niveles de investigación**: estudios con un animal entero, estudios con órganos aislados, estudios con cultivos de tejidos o de células, estudios con orgánulos celulares o estudios moleculares. Dependiendo de cuál sea el nivel en el que trabajemos (1) se necesitará más o menos **trabajo previo** para la preparación de las muestras experimentales y (2) se podrán utilizar una gama más o menos amplia de **técnicas y métodos de experimentación**.



1.- Estudios a nivel de organismo completo

En la mayoría de los casos se utilizan organismos modelo:

- **Animales:** rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), pez cebra (*Danio rerio*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), gusanos (*Caenorhabditis elegans*), etc.
- **Plantas:** arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*)
- **Microorganismos eucariotas:** levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)
- **Microorganismos procariotas:** bacterias (*Escherichia coli*)

En algunos casos, después del experimento (1) se pueden **extraer fluidos** corporales del animal para hacer estudios analíticos o (2) se puede proceder al **sacrificio** del animal y a la extracción de muestras para hacer estudios analíticos y/o morfológicos.

2.- Estudios a nivel de órgano entero

Los órganos se pueden estudiar (1) *in situ*, sin aislar el tejido del animal o (2), mediante **técnicas de disección**, extirpar el órgano y mantenerlo en un medio de incubación adecuado para hacer los experimentos. En algún caso también es posible **cultivar** los órganos extirpados fuera del organismo.

3.- Estudios a nivel tisular o celular

Muchos órganos están formados por distintos tejidos. Las **técnicas de disección** permiten separar un tejido de otro. Los tejidos así obtenidos (1) pueden estudiarse inmediatamente o (2) pueden cultivarse en un medio adecuado para su posterior estudio. Los tejidos mantenidos en cultivo se denominan **explantes primarios**.

Las **técnicas de disgregación** permiten separar las distintas células que integran el tejido. La disgregación puede ser de tipo mecánico, químico o enzimático. Debe ser lo suficientemente intensa como para permitir separar una célula de otra sin afectar a su integridad. Las células así obtenidas (1) pueden estudiarse inmediatamente o (2) pueden cultivarse en un medio adecuado para su posterior estudio.

4.- Estudios a nivel de orgánulos celulares

Para aislar los orgánulos celulares es necesario **romper la membrana plasmática** de las células correspondientes. Para ello se utilizan **técnicas de homogeneización**. La membrana plasmática se puede romper (1) mediante un simple **choque osmótico**, (2) mediante un **tratamiento químico o enzimático** o (3) utilizando diversos **métodos mecánicos** (homogeneizador de vidrio, batidora doméstica, ultrasonidos o prensa French).

En cualquier caso, este proceso debe llevarse a cabo en condiciones (pH, temperatura y concentración de determinados metabolitos) que mantengan íntegros y activos los diversos componentes celulares. Cuando las células han sido sometidas a un proceso de homogeneización, el medio resultante se denomina **homogenado celular** o **extracto crudo**.

5.- Estudios a nivel molecular

A partir de un extracto crudo se pueden utilizar diversas **técnicas de separación** para aislar (o purificar) la molécula que nos interesa estudiar. La purificación de la molécula se puede llevar a cabo (1) directamente a partir del extracto crudo o (2) a partir de un orgánulo concreto. En el primer caso, hay que romper la membrana plasmática mediante técnicas de homogeneización. En el segundo caso, además de la membrana plasmática, también hay que utilizar técnicas de homogeneización para romper la membrana (o membranas) del orgánulo.

La técnica de separación más utilizada es la **cromatografía**, en cualquiera de sus variantes. Una vez purificada la molécula a estudiar, se pueden llevar a cabo **estudios estructurales** o **estudios funcionales**.

FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN BIOQUÍMICA

Los experimentos que se llevan a cabo en un laboratorio de Bioquímica tienen como objetivo **separar, caracterizar, modificar o cuantificar** las biomoléculas. En la mayoría de los casos se trabaja con muestras complejas que contienen un gran número de biomoléculas distintas. Por este motivo, los métodos experimentales utilizados en Bioquímica tienen que ser **altamente específicos** y su funcionamiento **se basa en las propiedades físicas, químicas o bioquímicas de las biomoléculas**. El conocimiento cada vez más detallado de la estructura y función de las biomoléculas permite el desarrollo de nuevos y sofisticados métodos experimentales. A su vez, los nuevos métodos permiten adquirir nuevos conocimientos bioquímicos.

1.- Métodos basados en las propiedades químicas de las biomoléculas

Las biomoléculas poseen diversos grupos funcionales (hidroxilo, amino, carbonilo, carboxilo, etc.) que son los principales responsables de su comportamiento químico: reaccionaran con algunos compuestos y no con otros.

Algunos compuestos poseen propiedades químicas que les diferencian de otros como el color, olor, sabor, etc. Muchas biomoléculas tienen un **color característico** que permite identificarlos rápidamente (por ejemplo, el color rojo de la hemoglobina, el color naranja de los carotenos, el color verde de la clorofila, etc.). Además, la intensidad del color permite cuantificar la cantidad de sustancia presente en la muestra. La **capacidad para absorber o emitir luz** de una longitud de onda determinada también permite identificar y cuantificar bioelementos o biomoléculas.

Cuando una biomolécula no posee una característica química determinada que permita diferenciarla de las demás se le puede **hacer reaccionar** con otra molécula que le confiera alguna característica distintiva que se pueda medir como, por ejemplo, que precipite, que cambie de estado físico, que adquiera un **color** característico, que emita **fluorescencia** o **radiactividad**, que adquiera **actividad enzimática** o **actividad antigénica**, etc.

2.- Métodos basados en las propiedades físicas de las biomoléculas

Si queremos separar biomoléculas que tienen los mismos grupos funcionales, sus propiedades químicas serán muy parecidas o idénticas. Por tanto, habrá que utilizar métodos experimentales basados en las propiedades físicas de las biomoléculas como, por ejemplo, el **tamaño**, la **forma**, la **carga** o la **polaridad**. Esta última propiedad es especialmente importante, ya que afecta a la solubilidad, la volatilidad y a la capacidad de adsorción de las biomoléculas.

3.- Métodos basados en las propiedades bioquímicas de las biomoléculas

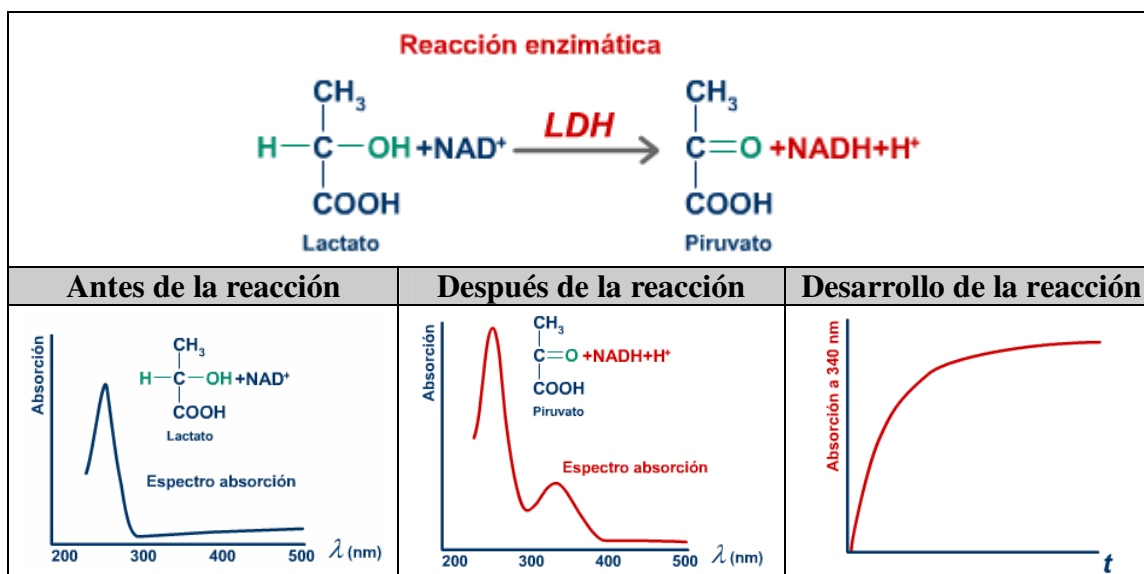
Estos métodos se han desarrollado gracias a los avances en la investigación bioquímica y están basados en las **interacciones específicas** que se establecen entre diversos tipos

de biomoléculas. Son muchas las interacciones específicas que permiten llevar a cabo experimentos en Bioquímica como, por ejemplo:

- Interacción enzima-sustrato
- Interacción antígeno-anticuerpo
- Interacción avidina-biotina o estreptavidina-biotina
- Formación de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias de los ácidos nucleicos

Métodos enzimáticos

Las muestras biológicas contienen muchos tipos distintos de proteínas y, en muchos casos, sus propiedades físicas y químicas son muy parecidas, lo que dificulta enormemente su separación y caracterización. Pero, afortunadamente, muchas proteínas son **enzimas** que reaccionan de forma específica con un sustrato para convertirlo en producto. La **actividad enzimática** está basada en la **interacción enzima-sustrato** y permite caracterizar y cuantificar este tipo de proteínas incluso en presencia de otras proteínas y biomoléculas. Cuando el sustrato o el producto presentan una característica química que se pueda medir, resulta relativamente sencillo seguir el desarrollo de una reacción enzimática, bien midiendo la **desaparición del sustrato** o bien midiendo la **aparición de producto**.



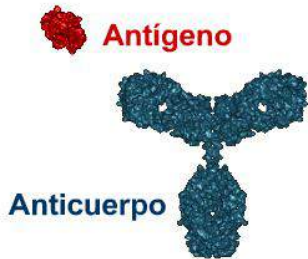
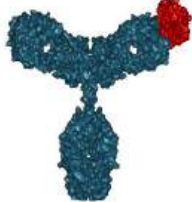
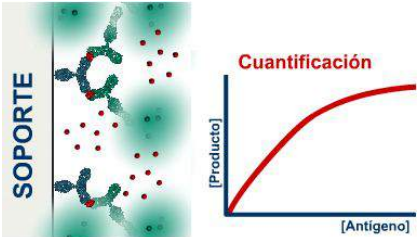
Cuando ni el sustrato ni el producto presentan una característica distintiva que se pueda medir, se pueden utilizar **reacciones acopladas**, en las que el producto de una reacción enzimática es el sustrato para otra reacción enzimática que sí presenta alguna característica química que se pueda medir.

Métodos inmunológicos

Estos métodos se basan en las **interacciones antígeno-anticuerpo**. Los anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas) son proteínas producidas por las células del sistema inmunitario que se unen a moléculas ajenas al organismo (antígenos) y las

neutralizan antes de que puedan causar daños irreparables. Cada anticuerpo se une de forma altamente específica a un sólo tipo de antígeno. La especificidad de la unión se debe a que las estructuras tridimensionales del antígeno y del anticuerpo presentan una **región de complementariedad** con superficies que encajan perfectamente entre sí, formando **complejos antígeno-anticuerpo** que, normalmente, **precipitan**.

Cuando no se forma un precipitado, la formación del complejo antígeno-anticuerpo puede **medirse de forma indirecta**, utilizando anticuerpos secundarios marcados con **isótopos radioactivos**, con **sustancias fluorescentes** o con **enzimas** que, al añadirles un sustrato, generen un producto coloreado (ver tabla inferior).

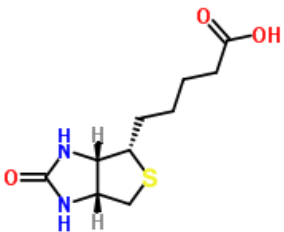
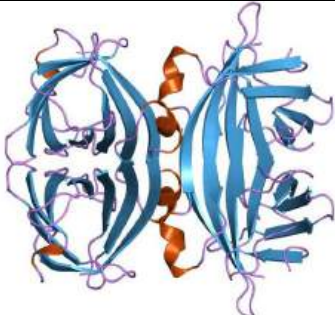
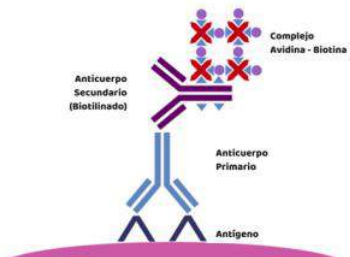
Antígenos y anticuerpos	Complejo antígeno-anticuerpo	Detección de la formación de complejos antígeno-anticuerpo
		

Interacción avidina-biotina o estreptavidina-biotina

La **biotina** es una vitamina, y un cofactor enzimático en reacciones donde se transfiere un grupo monocarbonado (habitualmente carboxilaciones).

La **avidina** es una glicoproteína presente en la clara de huevo. Ejerce una función protectora ya que su capacidad para captar la biotina (necesaria para el crecimiento de las bacterias) impide infecciones en el interior del huevo. La **estreptavidina** es una proteína que producen algunas bacterias del género *Streptomyces*. A pesar de guardar poca relación con la avidina, posee un sitio de unión para la biotina y una afinidad muy similares. Se cree que les sirve para competir con las bacterias vecinas de otras especies, a las que priva del necesario suministro de biotina.

La **constante de afinidad** del complejo biotina-avidina es de 10^{15} M, una de las más altas conocidas. A modo de referencia, la afinidad entre antígeno y anticuerpo suele ser de 10^{12} M.

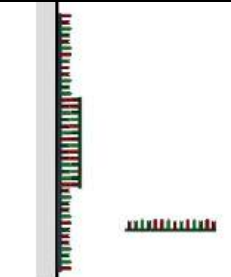
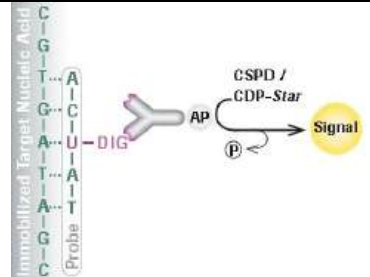
Biotina	Avidina	Detección de complejos Ag-Ac usando avidina-biotina
		

Métodos de hibridación

Estos métodos se basan en las **interacciones que se establecen entre pares de bases complementarias** en los ácidos nucleicos (la adenina se empareja con la timina o con el uracilo, mientras que la citosina se empareja con la guanina).

Se utilizan principalmente **para identificar moléculas de ADN o de ARN que presenten una secuencia determinada**. Para ello, es necesario disponer de una pequeña molécula de ADN o ARN complementaria a la secuencia que nos interesa. Esta molécula se denomina "**sonda**" y, normalmente, se sintetiza por métodos químicos (síntesis orgánica) o bioquímicos (reacción en cadena de la polimerasa, o PCR). El **emparejamiento entre la sonda y una molécula de ADN o ARN** que contenga una secuencia complementaria se denomina **hibridación**.

Para poder detectar y cuantificar la formación de híbridos es necesario recurrir a **métodos indirectos**. El método más habitual consiste en **marcar la sonda** con **isótopos radioactivos**, con **moléculas fluorescentes** o con algún **antígeno** que, posteriormente, pueda ser detectado con un anticuerpo unido a una enzima (ver la tabla inferior).

Ácido nucleico y sondas	Hibridación	Detección de híbridos	
		Mediante radioactividad o fluorescencia	Mediante anticuerpos unidos a una enzima
			

LOS RESULTADOS GENERADOS EN UN EXPERIMENTO BIOQUÍMICO

Los resultados que se obtienen tras haber realizado un experimento bioquímico pueden ser de distinta naturaleza:

1.- Cuantitativos



El resultado es **un número**. Según la propiedad que se esté midiendo, la cifra puede tener **unidades** o no. Si las tiene, son tan importantes como el propio valor numérico. Normalmente se utilizan las unidades del **Sistema Internacional** y, si se utiliza otro sistema de unidades, hay que indicarlo.

Cuando los números son muy grandes, o muy pequeños, se suelen expresar utilizando la **notación científica**. Se indica la parte entera con dos o tres decimales (con el redondeo adecuado), seguido de una potencia del número 10. Por ejemplo:

- $56.862 \text{ m} = 5,69 \times 10^4 \text{ m}$
- $0,008334 \text{ s} = 8,33 \times 10^{-3} \text{ s}$

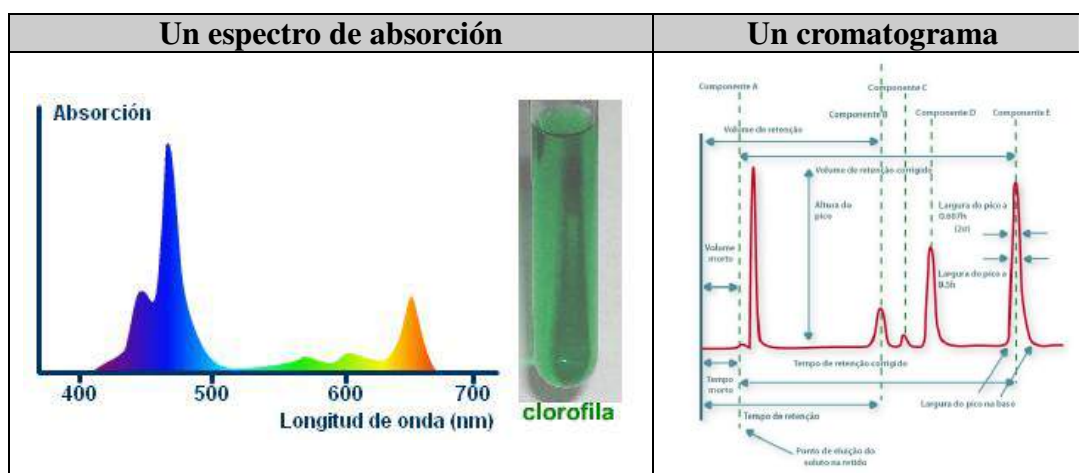
En muchos casos también se pueden utilizar los **múltiplos o submúltiplos** de las unidades. Por ejemplo:

- $0,000025 \text{ M} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M} = 0,025 \text{ mM} = 25 \text{ }\mu\text{M}$
- $18 \text{ }\mu\text{l} = 0,018 \text{ ml} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ l} = 0,000018 \text{ l}$

Lo normal es que el resultado numérico que proporciona el instrumento sirva de base para hacer otra **serie de cálculos que nos permita obtener el valor final** que estamos buscando. Por ejemplo, mediante una serie de operaciones matemáticas, los datos de absorbancia que nos da un espectrofotómetro se convierten en valores de concentración.

2.- Cualitativos

En este caso, el resultado del experimento no es un número, sino **un gráfico** generado por el propio instrumento de medida.



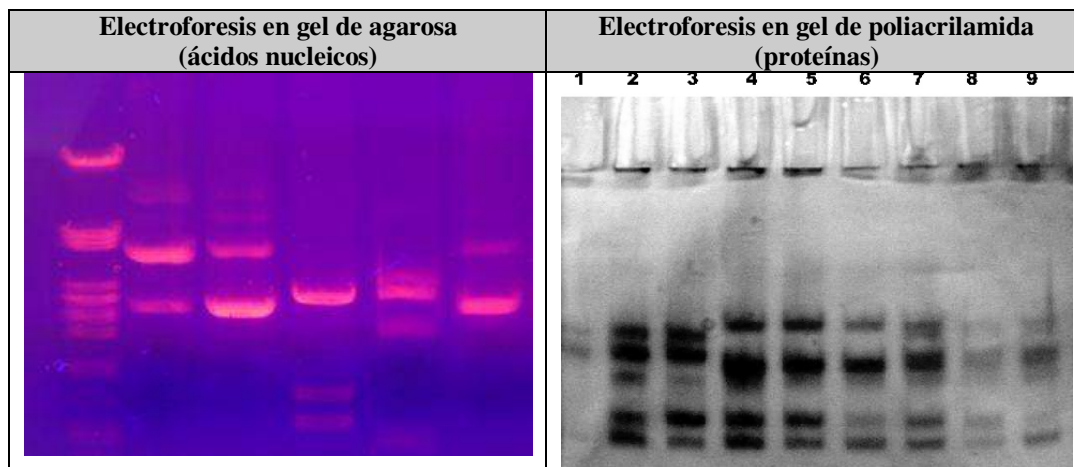
Estos datos son de naturaleza cualitativa porque nos permiten **identificar la presencia de una sustancia determinada** en una muestra biológica. Por ejemplo, los espectros de absorción (que indican la absorbancia de una muestra al iluminarla con luz de distintas longitudes de onda) presentan unos picos cuya posición es característica para cada sustancia y un cromatograma nos muestra en qué orden van saliendo los distintos componentes de una mezcla por el extremo inferior de una columna de cromatografía.

En muchos casos, **a partir del gráfico también es posible calcular cuánta sustancia hay** en la muestra, ya que la altura de los picos es directamente proporcional a la concentración.

3.- Semicuantitativos

Estos resultados **son cualitativos**, porque nos permiten detectar la presencia de una determinada biomolécula en la muestra. Sin embargo **no permiten cuantificar** exactamente la cantidad de sustancia presente. Lo que sí nos permiten es establecer comparaciones y afirmar que **la cantidad de sustancia presente en una muestra es mayor o menor que la de otra**.

En algunos casos, este tipo de información es relevante porque nos permiten saber, por ejemplo, si determinados tratamientos han permitido estimular o inhibir la expresión de algún gen. Ejemplos de este tipo de resultados son los geles de electroforesis de ácidos nucleicos o de proteínas.



CONTROLES

Cada vez que se hace un experimento en bioquímica es imprescindible hacer un experimento paralelo que nos sirva de **control** para poder comparar lo que ocurre en unas circunstancias con lo que ocurre en otras. Al experimento control se le puede denominar de distintas maneras (control, **referencia**, **blanco**, **cero**) pero todas ellas son equivalentes.

En los ensayos clínicos se somete a una serie de sujetos a un tratamiento con un fármaco experimental. Como control, se toma otro conjunto equivalente de sujetos y se le somete a un tratamiento inocuo, a fin de comparar lo que ocurre en un caso y en otro. Para evitar el efecto placebo en los sujetos estudiados se suele recurrir a la técnica del “**ciego**” en el que los pacientes no saben si están tomando el fármaco o el tratamiento inocuo. En otros casos, para evitar posibles interpretaciones sesgadas por parte de los investigadores, se utiliza la técnica del “**doble ciego**” en la que ni los sujetos investigados ni los investigadores saben qué tratamiento ha recibido cada individuo.