

Iniciación a la experimentación en el ámbito de la Biología Celular, Molecular, Genética y Evolutiva

Tema 6. Diseño experimental



OCW
OpenCourseWare



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

NAZIOARTEKO
BIKAINASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

¿QUÉ ES UNA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA?

Una investigación es un proceso mediante el cual, tras conocerse los datos existentes en un momento concreto sobre un tema científico determinado, y tras plantear una pregunta para la que no se conoce en ese momento la respuesta, se diseñan y realizan experimentos o pruebas que permiten descubrir nuevas informaciones y/o principios generales.



¿QUÉ ES UN EXPERIMENTO?

- Una investigación experimental pretende describir la causa de una situación concreta o el modo en el que varía esa situación cuando se modifica alguna variable de manera controlada.
- El experimento es un acto en el que el investigador introduce de forma deliberada determinadas variables, modificadas de una manera concreta, con la intención de medir su efecto sobre otras variables seleccionadas.



ETAPAS DE UNA INVESTIGACIÓN

- Identificar un Problema o una Pregunta, tras la realización de una revisión bibliográfica sobre el tema
- Definir la Hipótesis y las variables que serán objeto de estudio
- Diseñar un plan experimental
- Realizar de experimento
- Tratar estadísticamente los datos y probar su confianza
- Establecer conclusiones y comunicar los resultados



¿QUÉ ES UNA HIPÓTESIS?

- Una hipótesis de investigación es una posible solución a un problema de investigación.
- Debe de ser comprobable, en base a los conocimientos previos y a las técnicas experimentales existentes en el momento.



¿CÓMO SE PLANTEA UNA HIPÓTESIS?

- Los términos que se empleen deben ser claros y concretos.
- Si una hipótesis no puede ser sometida a verificación empírica, no tiene validez.
- Las hipótesis deben ser objetivas y no incluir ningún juicio de valor.
- Las hipótesis deben ser específicas.
- Las hipótesis deben estar relacionadas con los recursos y las técnicas disponibles.
- La hipótesis debe estar directamente relacionada con el marco de conocimiento en la investigación.



CARACTERÍSTICAS FORMALES DE LA ENUNCIACIÓN DE UNA HIPÓTESIS

- La Hipótesis debe incluir el menor número de términos/palabras posibles.
- Se formula como una afirmación (no como una pregunta)
- Debe poder ser respondida con un SI o con un NO
- Debe de poder ser comprobable
- Debe incluir en su formulación el problema que se quiere analizar



¿QUÉ SON LOS OBJETIVOS?

- Los objetivos son la motivación principal para realizar el estudio. Pueden ser generales o específicos.
- Objetivos generales: expresan la finalidad por la que se va a realizar el estudio.
- Los objetivos específicos detallan propósitos concretos de la investigación.



CARACTERÍSTICAS FORMALES DE LA ENUNCIACIÓN DE OBJETIVOS

- Un objetivo de investigación se enuncia siempre con un verbo en infinitivo, que responde a la pregunta ¿para qué?
- Algunos ejemplos de verbos habitualmente utilizados para enunciar objetivos: comprobar, describir, explorar, examinar, investigar, entender, comparar, evaluar, estimar, verificar, explicar, predecir...



¿QUÉ SE ENTIENDE POR "DISEÑAR UN PLAN EXPERIMENTAL"?

- Diseñar un experimento significa *planear* detalladamente una experimentación, de modo que permita obtener la información pertinente para el problema bajo investigación.
- El diseño de un experimento es la secuencia completa de pasos, prevista de antemano, que nos proporcionará unos datos obtenidos del modo apropiado para realizar un análisis objetivo de los mismos y para obtener deducciones válidas con respecto al problema establecido.



¿CÓMO DEBEMOS PLANTEARNOS UN DISEÑO EXPERIMENTAL?

- Debe proporcionar la máxima cantidad de información pertinente al problema bajo investigación.
- El diseño, plan o programa, debe ser tan simple como sea posible.
- La investigación debe efectuarse lo más eficientemente posible: debe ahorrar tiempo, dinero, personal y material experimental.

Un buen diseño experimental es el que proporciona la máxima cantidad de información al mínimo coste. 

ETAPAS DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Identificar la **unidad experimental** sobre la que se realizará el análisis
2. Determinar **cómo se va a medir** el efecto y cuáles son las **características y variables** que se van a considerar
3. Identificar los **factores** que pueden afectar a las características que se van a analizar: factores externos e internos, tratamientos, covariables,...
4. Especificar qué **tipo de técnicas** y medidas se emplearán y cómo se realizarán los análisis: condiciones del estudio (tratamientos), los factores que se estudiarán en la investigación y los controles (positivos, negativos, internos, externos,...) que se utilizarán. Esquematizar los pasos que se establecerán para el análisis
5. Determinar el **tamaño muestral** y/o las veces que se repetirá el experimento
6. Aplicar los **procedimientos estadísticos** que correspondan para determinar la importancia del efecto
7. Revisar las decisiones anteriores. Modificarlas si se considera necesario



A PARTIR DE ESTE PUNTO, COMIENZA LA APLICACIÓN DE LO APRENDIDO SOBRE :

- EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA
- LAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES QUE PODRÍAN UTILIZARSE

A FIN DE RESOLVER LA HIPÓTESIS Y DAR CUMPLIMIENTO DEL OBJETIVO GENERAL

RECUERDA LA HIPÓTESIS

PLANTEAMIENTO DE PARTIDA:

- Existe diversidad génica en el gen *MC1R* en las poblaciones humanas
- La secuencia ancestral del gen *MC1R* codifica una proteína funcional que permite la activación de la ruta de señalización que culmina en la síntesis de eumelanina.

La **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que modificaciones que alteran la conformación de la proteína *MC1R*, y especialmente aquellas que afectan a los residuos de aminoácidos que están evolutivamente muy conservados, afectan a su función.



RECUERDA LOS OBJETIVOS GENERALES DE ESTA INVESTIGACIÓN

1. Averiguar si la presencia de una de las variantes alélicas descritas en las poblaciones humanas que afecta a una de esas regiones conservadas, concretamente la mutación denominada R151C , provoca modificaciones en la proteína MC1R que puedan afectar a la capacidad de los melanocitos de sintetizar eumelanina y de bloquear la proliferación.
2. Si eso fuese así, y dado que la variante alélica tiene una amplia distribución entre las poblaciones humanas actuales y en otros grupos *Homo* ya extintos, el siguiente objetivo tiene que ver con analizar las implicaciones evolutivas y médicas que podría tener la distribución de esta variante, en relación a su capacidad de síntesis de eumelanina y de otras funciones en las que podría estar funcionalmente implicada la proteína MC1R.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar cómo afectan mutaciones en MC1R a la localización de la proteína en la célula
- 2.- Testar si mutaciones en MC1R resultan en alteraciones en la ruta de síntesis de melanina.
 - 2.1.- Analizar la expresión diferencial de genes implicados en la ruta de síntesis de la melanina en células portadoras de versiones WT y mutante de MC1R
 - 2.2.- Analizar la síntesis de melanina en células portadoras de versiones WT y mutante de MC1R
- 3.- Testar si mutaciones en MC1R tienen efecto en la proliferación celular
- 4.- Analizar las frecuencias de los diversos polimorfismos de MC1R en diferentes grupos humanos y testar si están bajo algún tipo de selección
- 5.- Predecir en qué regiones geográficas y/o poblaciones se espera una mayor/menor incidencia de melanoma.



APLICACIÓN DE LAS ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN AL CASO QUE SE PLANTEA EN ESTE CURSO

- Se trata de elaborar un diseño experimental (un esquema de plan de trabajo) para que, conocida la información que existe sobre el caso y enunciada la hipótesis y los objetivos que se pretenden (ver más adelante), sea posible responder con un Si o con un NO.
- Para elaborar el diseño experimental, se plantean una serie de preguntas que pueden utilizarse como una guía



SOBRE EL MODELO/UNIDAD EXPERIMENTAL

- ¿Qué modelo celular, y de qué especie, sería el más adecuado para realizar el análisis funcional de la síntesis de melanina en un experimento *in vivo*?
- ¿Cómo obtendrías células portadoras de la versión alélica humana mutada? ¿Y de la versión humana ancestral?



VARIABLES A MEDIR Y FACTORES Y CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR (I)

- ¿Cómo podrías determinar si se produce proteína de interés y en qué cantidad?
- ¿Cómo detectarías si la proteína de interés ocupa la posición celular esperada?
- ¿Cómo activarías la proteína MC1R?
- ¿Cómo podrías averiguar si esa activación altera la viabilidad de las células?



VARIABLES A MEDIR Y FACTORES Y CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR (II)

- ¿Cómo podrías conocer si la versión mutada activa la cascada de síntesis de melanina?
- ¿Qué genes elegirías para conocer el estado de la ruta de síntesis de melanina?
- ¿Cómo podrías determinar si el gen de interés se expresa y en qué cantidad?



VARIABLES A MEDIR Y FACTORES Y CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR (III)

- ¿Cuántas veces tendrías que realizar el experimento?
- ¿Cuántas muestras tratarías en cada experiencia?
- ¿Qué controles (positivos y negativos) crees que deben realizarse en cada paso del experimento?



VARIABLES A MEDIR Y FACTORES Y CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR (IV)

- ¿Cómo podrías acceder a la secuencia nucleotídica del gen *MC1R*?
- ¿Qué herramientas informáticas podrías utilizar para conocer y comparar la variabilidad que se ha descrito en las poblaciones actuales humanas actuales en este gen?
- ¿Cómo podrías determinar si el gen *MC1R* está bajo selección natural?



VARIABLES A MEDIR Y FACTORES Y CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR (V)

- ¿Qué método emplearías para analizar el grado de conservación de esta secuencia en otras especies del género *Homo*?
- ¿Cómo analizarías si se ha descrito alguna asociación entre variantes del gen *MC1R* y caracteres fenotípicos, como pelo rojizo o piel clara?
- ¿Qué método emplearías para analizar si existe alguna asociación entre variantes de *MC1R* y susceptibilidad a melanoma?



VARIABLES A MEDIR Y FACTORES Y CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR (VI)

- ¿Qué métodos estadísticos aplicarías en cada metodología para probar el efecto detectado?

