

NEFROLOGIA. Vol. XVIII. Supl. 6. 1998

Los pasos debidos en el proceso investigador

S. Lamas

Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

INTRODUCCION

La metodología de algo tan amplio como el proceso investigador puede estudiarse desde diferentes perspectivas. Entre ellas se sitúan la filosofía de la ciencia, la psicología y la pedagogía. Como es lógico existe una información acumulada tan abundante sobre este tema en cualquiera de las áreas citadas que sobrepasa cualquier intento de resumirla en pocas páginas. Sin embargo, a la luz de las nuevas corrientes de pensamiento sobre el quehacer clínico diario-medicina basada en el hecho probado parece necesario revisar el proceso que nos permite progresar en el conocimiento de un problema de una manera ordenada. Para ello este artículo pretende revisar brevemente 3 aspectos:

a) Elementos necesarios para llevar a cabo una investigación en el campo de la medicina clínica o experimental.

b) Características diferenciales de la investigación experimental y clínica.

c) Requisitos y limitaciones a la hora de establecer una relación causa-efecto.

ELEMENTOS NECESARIOS EN EL PROCESO INVESTIGADOR

En primer lugar es necesario formularse una pregunta que puede surgir a partir de la observación de un fenómeno o de la lectura de un trabajo. Inmediatamente después viene el proceso de indagación acerca de lo que hay hecho sobre la pregunta formulada. Si bien es frecuente hoy en día que esa pregunta haya surgido antes y por tanto que exista abundante información acerca de la misma, es probable que haya aspectos concretos de la pregunta aún no resueltos o incluso que las respuestas al problema sean poco claras o contradictorias. En este

sentido es importante realizar una revisión crítica de la literatura y recurrir en lo posible a las fuentes originales y no únicamente a revisiones. Además conviene obtener información de diferentes disciplinas (clínica, biológica, bioquímica) para abordar la contestación a nuestra pregunta con una perspectiva lo más amplia posible.

Una fase esencial del proceso investigador es la enunciación de una hipótesis o conjetura que pueda contestar satisfactoriamente la pregunta planteada. Para poder progresar es necesario asegurarnos de que la hipótesis puede ser evaluada, esto es, ser sometida a contrastación en alguna medida. Una hipótesis puede ser en principio, evaluable, aunque en el momento de enunciarla no se disponga de la tecnología adecuada. Por ejemplo: «si existen otras estrellas además del sol, es probable que haya otros mundos habitados». Pueden existir hipótesis no evaluables por su propia fundamentación. Por ejemplo: «la tierra está gobernada por marcianos invisibles». Conviene sin embargo, en términos prácticos alejarse de cualquiera de los supuestos anteriores, ya que no nos permiten progresar en el conocimiento de un problema. A continuación es necesario revisar de nuevo la literatura a la luz de nuestra hipótesis y comenzar el proceso de su contrastación.

Es importante recordar que en las ciencias naturales en general y en las ciencias biomédicas en particular, el tipo de inferencia o razonamiento empleado es de naturaleza inductiva. Ello quiere decir que se parte de hechos u observaciones que se refieren a casos particulares y llevan a una conclusión cuyo carácter es el de una ley o principio general. Teniendo en cuenta la imposibilidad de estudiar todos los casos particulares se acepta que las premisas de una inferencia inductiva implican la conclusión sólo con un grado más o menos alto de probabilidad. Ello contrasta con los razonamientos de naturaleza deductiva, donde a partir de principios generales se progresa hacia casos particulares. En este último caso, si las premisas son correctas, las conclusiones sí alcanzan la categoría de certeza. A pesar de este tipo de limitaciones, más dentro del campo de la lógica formal, el abordaje de tipo inductivo ha sido la base de todo el progreso en medicina y otras ciencias experimentales.

Correspondencia: Dr. Santiago Lamas
Centro de Investigaciones Biológicas-Instituto Reina Sofía de
Investigaciones Nefrológicas (IRSIN)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Velázquez, 144
28066 Madrid

La fase de contrastación de la hipótesis es también una fase compleja de todo el proceso investigador y de su correcto diseño depende en gran medida nuestra capacidad para obtener conclusiones correctas. En general se trata de situar nuestro problema o pregunta bajo condiciones específicas de contrastación que sean lo más controlables posibles. En estas condiciones es esperable obtener resultados reproducibles, siendo la reproducibilidad un hecho necesario aunque no suficiente, para dotar de capacidad contrastadora a esta fase del proceso investigador. Cuando es posible intentar probar la validez de nuestra hipótesis mediante un abordaje experimental algunos aspectos pueden resultar más sencillos que en caso contrario. Podemos entonces establecer unas condiciones determinadas de experimentación y comprobar si se produce el hecho o efecto predicho por la hipótesis. Además, dentro de esas condiciones, podemos variar cada una de ellas por separado, manteniendo las demás constantes, con el fin de dar con aquella variable más estrechamente relacionada con el efecto implicado por nuestra hipótesis. Chocamos aquí sin embargo con la primera de las grandes limitaciones en el terreno de la medicina y es la imposibilidad de someter a contrastación experimental la validez de determinadas hipótesis suscitadas ante determinados problemas. En general cuando el control experimental es imposible debemos intentar contrastar la hipótesis de un modo no experimental, buscando o esperando que se produzcan casos en que esas condiciones especificadas se den espontáneamente, y comprobando luego si se produce el fenómeno esperado. Sin embargo ante problemas clínicos podemos recurrir a otro tipo de herramientas, con frecuencia diferentes a las empleadas en una contrastación experimental.

No debe olvidarse que el paso final del proceso de investigación es el análisis de resultados. Esta fase debe efectuarse con el máximo rigor y espíritu crítico, intentando descartar siempre mediante el análisis de un elevado número de datos, la posibilidad de que el resultado esperado se haya producido por azar. Para ello en el caso de variables cuantitativas deben utilizarse pruebas estadísticas indicadas para cada caso y cuya comprensión sea exhaustiva. En el caso de variables cualitativas (presencia o no de una proteína) la interpretación puede ser más clara. Sin embargo, en el caso de estar analizando grados de abundancia de dicha variable cualitativa (mayor o menor expresión de un gen por ejemplo) debe hacerse un esfuerzo por cuantificar los datos, con el único objetivo de hacerlos más representativos al proceder a su análisis estadístico. Cuando los datos son radicalmente contradictorios se debe re-analizar el paso previo y en cualquier caso repetirlo hasta

obtener resultados claramente reproducibles. En ningún caso es aceptable el «maquillaje» sesgado de los datos suprimiendo los valores superior e inferior o intentando magnificar las diferencias mediante trucos en la representación gráfica. Siempre es preferible la representación de los valores absolutos con sus errores estándar, aunque la representación en términos de porcentaje pueda resultar aceptable y a veces necesaria.

Finalmente no hablaremos aquí de la fase de presentación de resultados o de su divulgación correcta, ya que ello requeriría un capítulo aparte.

Características diferenciales de la investigación experimental frente a la investigación clínica

En general cuando el material de experimentación consiste en productos aislados (por ejemplo una proteína purificada), células en cultivo o animales de experimentación tenemos la capacidad de variar las condiciones de experimentación dentro de un amplio margen, con el fin de establecer las circunstancias que se adapten a la premisa de nuestra hipótesis. Ello tiene enormes ventajas ya que permite aislar e identificar los resultados derivados de la variación de cada condición. Por ejemplo podemos exponer células o animales a diferentes combinaciones de estímulos y evaluar luego la respuesta celular mediante un determinado bioensayo u otro parámetro cuantificable que nos permita confirmar o refutar la hipótesis planteada. Además ganaremos mucha información adicional dado que podremos introducir en el experimento una panoplia de condiciones similares o contrarias a la condición de nuestro interés inicial. De aquí se deriva un concepto importante y es la posibilidad y la necesidad de introducir controles positivos y negativos del experimento. Por ejemplo una manera de discriminar si un experimento no ha funcionado porque la hipótesis es incorrecta o por un problema exclusivamente técnico, consiste en introducir en el experimento un estímulo *que sabemos con certeza* produce el efecto esperado. Este sería nuestro control positivo. Asimismo se debe introducir una condición en la que el estímulo no debe producir el efecto esperado (control negativo). En presencia de un efecto esperado producido en las condiciones del control positivo y ausente en las del control negativo podremos concluir con cierto grado de fiabilidad si nuestra hipótesis es o no correcta, al poder comparar con dichos controles lo sucedido en las condiciones experimentales que se pretenden evaluar. Aunque un resultado negativo no descarta necesariamente la hipótesis de partida, la debilita, y rara

vez constituye por sí mismo un incremento de información significativo.

Una ventaja adicional de la investigación experimental consiste en la *capacidad de intervención* con el fin de corroborar una determinada hipótesis. Pongamos por caso que en un conjunto de animales de experimentación se reproduce un efecto B ante un estímulo A. Una posibilidad para probar la relación entre A y B (no hablamos aquí todavía de relación causa-efecto sino simplemente de descartar que la asociación entre A y B sea un epifenómeno) consiste en establecer una determinada condición experimental que bloquee de forma selectiva y específica el estímulo A una vez haya tenido lugar, y comprobando si aparece o no el efecto B. Ello nos aproxima al problema de establecer con alta probabilidad la relación causal entre dos fenómenos, lo que analizaremos más adelante.

El problema con la investigación clínica deviene del hecho de que el objeto de experimentación es cualitativamente diferente (no desde el punto de vista biológico pero sí desde el bioético) a los casos anteriores. Ello impide que podamos manipular las condiciones experimentales más allá de un cierto límite. Asimismo es claro que la intervención queda limitada a situaciones donde se cumplan todos los requisitos éticos que el caso requiera. Sin embargo, es importante resaltar que las mismas leyes de la lógica y el mismo rigor en las fases de elaboración y contrastación de la hipótesis son aplicables a la investigación clínica. Lo que varía son las herramientas de análisis. En la aproximación propuesta por la corriente de «medicina basada en el hecho probado» se insiste en dos aspectos fundamentales: la capacidad de seleccionar la información críticamente y el conocimiento profundo de la metodología epidemiológica y de la ciencia estadística. Este último aspecto es de una importancia capital ya que nos va a permitir establecer el criterio adecuado en cuanto al número y composición de la población control y población de estudio, introducir todos los elementos necesarios para que se puede realizar un análisis estadístico correcto *a posteriori* y definir los criterios de aleatoriedad (doble ciego, placebo controlado, asignación al azar, características prospectivas y duración del estudio) necesarios para optimizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Con frecuencia sin embargo nos encontramos ante el hecho de que un ensayo clínico bien diseñado y llevado a cabo sugiere que en un determinado problema la presencia de un dato A se asocia con el desarrollo de un efecto B. Aún cuando todos los criterios de fiabilidad del estudio se cumplan es importante subrayar que *una mera asociación entre dos fenómenos no determina una relación causa-efecto*. ¿Cómo podemos entonces, ya sea en investigación

experimental o clínica, establecer que un proceso es la causa de otro?

Requisitos y limitaciones para establecer una relación causa-efecto

Este problema es claramente común al contexto experimental y al clínico. Se trata de, una vez establecida de modo altamente probable la asociación entre 2 fenómenos, probar la dependencia de uno con respecto al otro. Por ejemplo podemos hipotetizar: «A la luz de los conocimientos actuales es razonable pensar que el óxido nítrico (NO) es un regulador central de la presión arterial en el ser humano». Para ello podemos apoyarnos en diversos estudios realizados en células y animales que sugieren que muy probablemente el endotelio de los mamíferos libera esta sustancia y que esta sustancia es vasodilatadora. Además los ratones transgénicos donde se ha suprimido selectivamente el gen que codifica para la enzima encargada de la síntesis de NO en el endotelio (ratones knockout para la isoforma eNOS) tienen la presión arterial elevada. Sin embargo en el ser humano la evidencia en la que apoyarnos no es tan contundente. Sabemos por ejemplo que los nitritos, nitratos y nitroprusiato sódico que se emplean de modo terapéutico son vasodilatadores, pero ello no prueba necesariamente que sea a través de NO. Asimismo se sabe que la administración local de un antagonista de las óxido nítrico sintasas aumenta las resistencias vasculares en esa zona, pero ello tampoco es una evidencia definitiva. Además sabemos que la inhalación de NO mejora los cuadros de hipertensión pulmonar primaria en neonatos afectados de este problema y que en pacientes con hipertensión pulmonar hay una disminución de la expresión de la eNOS. Todo ello, aunque sugiere claramente que nuestra hipótesis es válida, no la prueba de forma concluyente ni siquiera establece que sea altamente probable ya que es fácil encontrar explicaciones alternativas o mecanismos indirectos, todos ellos plausibles, que den cuenta de las observaciones anteriores. Así pues no habría más remedio que recurrir a un protocolo que suprimiera de forma eficaz la síntesis de NO en el endotelio en un grupo de pacientes y determinar la presión arterial en los mismos, comparándolo con un grupo control donde no hubiéramos realizado tal modificación. Como es obvio tal protocolo es éticamente inaceptable y técnicamente imposible en el momento actual.

A pesar de todo, parece necesario buscar alguna fórmula para poder establecer este tipo de relación causal. Por ejemplo, es posible proponer una aproximación válida tanto para la medicina experimen-

tal como clínica, inspirada en los postulados de Koch. Estos postulados fueron enunciados por Koch a finales del siglo XIX aunque habían sido en parte propuestos por Henle (conocido histólogo que describió entre otras cosas el asa que lleva su nombre), y trataban de establecer de manera inequívoca los criterios por los cuales un determinado microorganismo puede ser considerado el agente causal de una enfermedad infecciosa. Su enunciación original fue la siguiente:

- 1) El microorganismo debe ser encontrado en todos y cada uno de los casos de enfermedad.
- 2) Debe ser posible aislarlo y crecerlo en cultivo puro.
- 3) El cultivo puro debe, cuando se reinocula a un animal susceptible, ser capaz de reproducir la enfermedad.
- 4) El microorganismo debe ser observado en y recuperado del animal inoculado experimentalmente y al que se ha causado enfermedad.

Una adaptación de estos postulados puede servir como guía para establecer una relación causa-efecto en la investigación biomédica, ya sea de carácter clínico o experimental. Podría formularse así: Para que un fenómeno A pueda ser considerado causa de un efecto B deben cumplirse los siguientes criterios:

- a) Siempre que tenga lugar A debe encontrarse B.
- b) Cuando se impide la acción de A (mutación, fármaco, inhibidor específico, etc.) no tiene lugar B.
- c) Si en la situación anterior re-introducimos el fenómeno A debe necesariamente aparecer B.

De nuevo nos encontramos con la situación de que en los estudios experimentales es posible establecer las condiciones de los apartados anteriores (hacerlo de forma elegante e incontrovertible es harto difícil sin embargo y ello diferencia la buena de la mala ciencia) mientras que en un contexto clínico la intervención (necesaria en el apartado B) o la reproducción del efecto (apartado C) chocan inevitablemente con barreras éticas o metodológicas.

Con todo, esta reflexión previa es necesaria aunque no debe suponer un obstáculo para emprender estudios clínicos bien diseñados que permitan establecer una correlación positiva o negativa tan importante como para asumir que dicha correlación podría tener características de relación causa-efecto. Al fin y al cabo la aproximación a la verdad en las ciencias naturales es, por la propia esencia de la inferencia inductiva en la que se basa (aunque luego pueda ser deductiva en un segundo término), siempre asintótica, y nuestro intento debe ser siempre el de producir un incremento en esta función de aproximación. Naturalmente la importancia de este incremento será tanto más grande cuanto menos sepamos del problema y cuanto más correctos sean nuestros diseños, experimentales o clínicos, para acercarnos a su solución. Por ello es necesario recordar el viejo proverbio chino: «Si vas a dar mil pasos cuida bien en que dirección das el primero».

Agradecimientos

Al Dr. Javier Rey Campos, del Centro de Investigaciones Biológicas, por los muchos ratos agradables discutiendo estos problemas y por sus sugerencias sobre el texto.

BIBLIOGRAFIA

1. Beveridge WIB: The art of Scientific investigation. Vintage books. New York 1957.
2. Hempel CG: Filosofía de la ciencia natural. Alianza Universidad. Madrid 1966.
3. Himsforth H: Scientific knowledge and philosophic thought. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London 1986.
4. Dorland's illustrated medical dictionary. 25th Edition. Saunders, Philadelphia, London, Toronto 1974.
5. Penso G: La conquête du monde invisible. Le Editions Roger Dacosta-Paris 1981.