

# TEORÍA CELULAR

## ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA CÉLULA

Cuando aún no existía el microscopio se creía que los seres vivos estaban constituidos por una sustancia especial que sólo ellos podían elaborar y que tenía diferente consistencia en los distintos tejidos. En 1665 Robert Hooke observó por primera vez celdillas en el corcho. El corcho es un tejido muerto cuyas células han muerto porque la pared se ha impregnado de sùber (corcho) y el citoplasma se ha reabsorbido. Les llamó a esas estructuras celdillas (cells).

En 1835 Schleiden y Schwann emitieron la teoría celular, según la cual todos los seres vivos, animales y vegetales, estaban constituidos por células, es decir, las células son las unidades morfológicas y fisiológicas de los seres vivos. En 1859 Virchow propone que cada célula proviene de otra célula "**Omnis cellula e cellula**" y sugiere que todas las enfermedades son alteraciones de las células. Como la membrana plasmática no es visible al microscopio óptico, durante mucho tiempo persistió la Teoría del reticularismo en los animales: "Un animal es una comunidad de citoplasmas y núcleo sin compartimentar". Más tarde la Teoría del reticularismo quedó restringida al sistema nervioso hasta que Ramón y Cajal demostró que también el tejido estaba formado por células individuales. Hoy en día salvo algunas excepciones se admite el individualismo celular.

La teoría celular, emitida por **Schleiden y Schwann** expresa que todos los seres vivos a excepción de los virus están formados por células. Las formas más simples de vida son las células libres que se reproducen multiplicándose (o dividiéndose) por dos. Algunas de ellas son procariontes (sin verdadero núcleo). Los organismos superiores están formados por un gran número de células que realizan funciones especializadas y que se comunican mediante sistemas muy complejos. Se cree que todos los organismos celulares descienden de una célula ancestral (primaria) común. A partir de ahí han evolucionado todos los seres vivos. La evolución implica 2 procesos esenciales:

- \* La aparición de una variación producida por el azar de una información genética que se transmita de un individuo a sus descendientes.

- \* Que se seleccione esa información genética porque es beneficiosa para su portador.

Si tenemos en cuenta los orígenes de la primera célula en la tierra, tenemos que estudiar cómo se replican ciertos tipos de grandes moléculas (como los ácidos nucleicos), replicación que permita que haya una variante en la información genética y por lo tanto que se seleccione una o otra variante de esa información genética.

### DESDE LAS MOLÉCULAS A LAS PRIMERAS CÉLULAS

Se supone que la tierra en sus orígenes era un lugar violento con gran cantidad de erupciones volcánicas, lluvias torrenciales, no había oxígeno molecular, no existía la capa de ozono y se supone que la tierra estaba formada por amoníaco y metano. Es probable que en esas condiciones se produjeran **moléculas orgánicas**, es decir, moléculas ricas en carbono. En experimentos de Laboratorio se ha conseguido, y esto pone de manifiesto el hecho de que la formación de moléculas es extraordinariamente fácil, más si se tiene en cuenta que se puede considerar a la Tierra como un gigantesco laboratorio y que además el proceso se realizó durante cientos de millones de años. De esta forma se supone que se generaron las 4 clases de moléculas que se encuentran en las células: **aminoácidos**, **nucleótidos**, **azúcares** de bajo peso molecular y **ácidos grasos**. Se supone que estas moléculas orgánicas simples se acumularon en concentraciones elevadas en algún lugar y en algún momento.

Una vez que tenemos moléculas pequeñas, se pueden polimerizar y se pueden obtener polipéptidos a partir de los aminoácidos y polinucleótidos (DNAs y RNAs) a partir de los nucleótidos. Hoy en día sabemos que **se necesitan enzimas** para que se produzcan estas polimerizaciones. Entonces, en el caldo prebiótico (primitivo) no debían existir estas enzimas proteicas, pero probablemente existían iones metálicos, minerales, que podrían haber actuado como catalizadores. El **aumento de la temperatura** también pudo beneficiar la síntesis de polímeros de longitud variable y secuencia aleatoria. Una vez formados, algunos de estos

polímeros podrían influir sobre la formación de otros polímeros, Por ej. Los polinucleótidos pueden especificar la secuencia de nucleótidos de otros polinucleótidos, actuando como patrones para las reacciones de polimerización.

En estas condiciones es probable que la reproducción de los nucleótidos se hiciera con mucha lentitud y que se produjeran errores en el proceso de copiado. Además, no todos los polinucleótidos tienen igual capacidad de replicación, de modo que, al cabo de un tiempo (y esto sucede también en el laboratorio) llegan a predominar varias secuencias favorables. **Un polinucleótido, como una molécula de RNA, tiene dos características importantes:**

1. Transporta **información codificada** y su secuencia de nucleótidos se transmite por el proceso de replicación (información). La secuencia de nucleótidos es análoga a la información hereditaria o genotipo.
2. Tiene una **estructura plegada** única que determina como funcionará y responderá a las condiciones externas (función). La estructura tridimensional plegada es análoga al fenotipo, la expresión de la información hereditaria sobre la que actúa la selección natural.

Se admite la idea de que hace unos 4000 millones de años, **los sistemas capaces de producir la autorreplicación de polinucleótidos**, iniciaron el proceso de la evolución. Estos polinucleótidos pudieron empezar a dirigir la síntesis de polipéptidos a partir de aminoácidos y entre estos polipéptidos habría proteínas enzimáticas que catalizarían multitud de reacciones. Este proceso sería similar en aquel entonces al ciclo vital de algunos virus que conocemos hoy en día.

El segundo acontecimiento importante en esa evolución debe haber sido probablemente **el desarrollo de una membrana externa**. **Todas las células**, actualmente, están rodeadas de una **membrana plasmática**. Se supone que la primera célula se formó cuando las moléculas de fosfolípidos de aquel caldo primitivo se ensamblaron espontáneamente y formaron estructuras membranosas que incluyeron en su interior ácidos nucleicos y moléculas de proteínas.

## REVISIÓN HISTÓRICA SOBRE EL CONCEPTO DE CÉLULA

El conocimiento de la existencia de células nace con el microscopio óptico. Lo que se sabe hoy en día se debe a la acumulación de observaciones y al desarrollo de técnicas cada vez más precisas.

Los primeros conocimientos de la estructura celular datan de **1665**, cuando **Robert HOOKE**, observando al MO una laminilla de corcho, vio unas cavidades parecidas a las celdillas de un panal y las denominó células, en inglés **“cell” (celda)**. Estas celdillas eran en realidad las paredes celulares, fuertemente engrosadas por suberina, de células muertas del corcho (corteza del alcornoque, *Quercus suber*).

En **1673 LEEUWENHOEK**, con un microscopio de su invención, observó y dibujó **organismos unicelulares** de aguas estancadas.

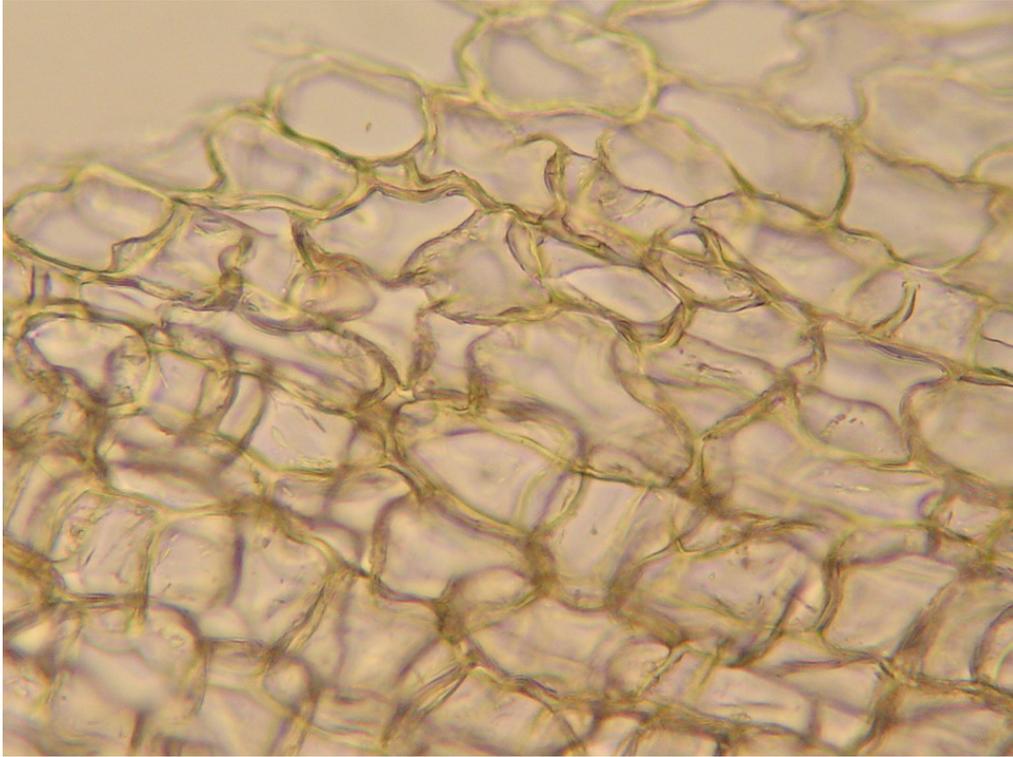
En **1774 CORTI** señaló la presencia de un medio *interno intracelular*.

En **1781 BROWN** descubrió en células animales un corpúsculo al que denominó **núcleo**.

En **1833 DUJARDIN** describió el contenido celular como **una sustancia gelatinosa**, homogénea, elástica y sin trazas de organización.

En **1838 PURKINJE** dio el nombre de **protoplasma** a ese medio y definió la célula como **“un grumito de protoplasma, en cuyo interior se encuentra el núcleo”**.

En **1838 SCHLEIDEN** integró todos los conocimientos anteriores y afirmó que **todos los vegetales estaban constituidos por células**.



**Células de corcho** (corteza del alcornoque *Quercus suber*), con la pared suberificada y muertas, tal como las pudo haber visto Robert Hooke, x400. Bueno, él las vería un poco peor porque no tenía nuestros microscopios. Y además no podía fotografiarlas. Fotografía: Geni Álvarez.

## 2. TEORÍA CELULAR

En 1839 SCHWANN extendió los postulados de SCHLEIDEN a los animales empleando por primera vez el término “**teoría celular**” que expresa que:

1. Todos los seres vivos están constituidos por células.

En 1855 WIRCHOW añade al postulado anterior los siguientes que completan la teoría celular:

2. Toda célula procede de otra célula por división de esta última.
3. Existen seres unicelulares y pluricelulares.
4. Los gérmenes de la reproducción (gametos) son también células.

**RESUMEN:** La Teoría celular de SCHLEIDEN, SCHWANN y WIRCHOW expresa que:

1. **Todos los seres vivos están constituidos por células.**
2. **Toda célula procede de otra célula por división de esta última.**
3. **Existen seres unicelulares y pluricelulares.**
4. **Los gérmenes de la reproducción (gametos) son también células.**

Esta teoría condujo a la **definición de célula: es la unidad morfológica y fisiológica de los seres vivos**. Unidad morfológica porque todos los seres vivos están constituidos por células y unidad fisiológica porque las células poseen los mecanismos bioquímicos necesarios para que se de la vida.

## FORMA Y TAMAÑO DE LAS CÉLULAS.

Recordad las unidades de medida en citología:

$$1\text{ m} = 10^3\text{ mm}$$

$$1\text{ mm} = 10^3\text{ }\mu\text{m} \text{ (micras o micrómetros)}$$

$$1\text{ }\mu\text{m} = 10^3\text{ nm} \text{ (nanómetros o milimicras m}\mu\text{)}$$

$$1\text{ nm} = 10\text{ \AA} \text{ (Angstroms)}$$

### Forma

Aunque es un poco pronto y abstracto hablar ahora de la forma de las células, porque lo detallaremos cuando expliquemos la célula procariótica y eucariótica, si podemos decir que las células son cuerpos tridimensionales, algo que, a veces, a los alumnos les cuesta reconocer, porque en realidad ven casi siempre cortes de células.

En general las células tienen formas esféricas (o globosas) o prismáticas, pero hay casi tantas formas como tipos celulares:

**Células procarióticas:** cocos (redondeadas), bacilos (alargadas) espirilos (alargadas y retorcidas como un sacacorchos), en forma de coma (vibrios).

**Células eucarióticas vegetales:** casi siempre son globosas o prismáticas, al menos en vegetales superiores. Las células reproductoras masculinas en vegetales inferiores suelen ser algo alargadas y poseer flagelos. Las femeninas tienden a ser esféricas, más grandes y en menor número.

**Células eucarióticas animales:** planas, cúbicas o prismáticas (también llamadas cilíndricas) en los epitelios; fusiformes (con forma de huso), estrelladas en el tejido conjuntivo; fusiformes también en el tejido muscular, discos bicóncavos (eritrocitos) o redondeadas en la sangre, redondeadas o esféricas en muchos tejidos. ¿Qué forma tienen las neuronas?. Las células reproductoras femeninas tienden a ser esféricas y las masculinas alargadas y flageladas.

Si hablamos de las formas de los Protozoos (animales unicelulares) tendríamos que describir muchos tipos, porque son las células más complejas que se conocen, son auténticos organismos unicelulares, es decir, poseen auténticos “órganos” dentro de la célula. Son las amebas (forma irregular y cambiante), los paramecios (forma de zapatilla), las vorticelas (forma de embudo), los tripanosomas (alargados y flagelados) etc.

### Tamaño

Es también muy variado, en general menor en las células procarióticas (1-2  $\mu\text{m}$ ). Entre las eucarióticas el tamaño es muy dispar, los Protozoos presentan a veces células de gran tamaño, un paramecio puede medir más de 500  $\mu\text{m}$ .

Si nos centramos en los Metazoos (animales pluricelulares), Vertebrados (con esqueleto) y Mamíferos (con glándulas mamarias y pelo) y concretamente en el hombre, las células más pequeñas de nuestro organismo son los glóbulos rojos (con forma de disco bicóncavo de 2 x 7  $\mu\text{m}$ ) y las mayores son las neuronas de Purkinje, con 200  $\mu\text{m}$ . A veces las neuronas tienen axones de varios metros de longitud (cetáceos marinos). Otros tamaños de células en el hombre son los siguientes:

Hepatocito o célula hepática: 20  $\mu\text{m}$ .

Espermatozoides: 53  $\mu\text{m}$  incluido el flagelo.

Óvulo humano 150  $\mu\text{m}$ .

Las células más grandes de la naturaleza son probablemente los huevos de las aves y los reptiles.

## SERES UNICELULARES Y PLURICELULARES

Repasar la Introducción a la Biología de principios de curso y las clasificaciones de los seres vivos.

**Nivel unicelular:** muchos organismos son unicelulares (están constituidos por una única célula). En algunos casos las células se asocian formando colonias, pero no se establecen relaciones fisiológicas entre las células, no existen tejidos ni distribución de funciones entre los distintos tipos de células. Los individuos unicelulares pueden ser a su vez

-**procariontes**, sin verdadero núcleo (*pro*=antes, *carion*=núcleo, *ontes*=ser). Son procariontes las bacterias, las algas cianofíceas (o cianobacterias) y los micoplasmas.

-**eucariontes**, (*eu*=verdadero, *carion*=núcleo, *ontes*=ser). Son eucariontes unicelulares algunas algas (en todos los grupos de algas hay especies unicelulares), algunos hongos, todos los protozoos.

Es decir, son organismos unicelulares todos los **procariotas** y algunos **eucariotas**.

**Nivel pluricelular:** Comprende aquellos individuos constituidos por muchas células que se agrupan para formar tejidos. Aunque no haya verdaderos tejidos (vegetales inferiores y metazoos primitivos) o no estén bien diferenciados, se establecen ya relaciones fisiológicas entre las células y aparece al menos una división entre células vegetativas y células reproductoras. En la mayoría de los casos aparecen tejidos bien desarrollados.

Los tejidos son conjuntos de células que realizan una misma actividad y que tienen el mismo origen. Los tejidos se agrupan en órganos y los órganos en aparatos o sistemas. Una aparato consta de tejidos y órganos variados, mientras que en un sistema predomina fundamentalmente un solo tipo de tejido (se habla de sistema nervioso, sistema muscular, sist. endocrino, sist. óseo y de aparatos digestivo, respiratorio, excretor etc.).

Los pluricelulares, por supuesto, son siempre **eucariotas**.

## DIFERENCIACIÓN Y ESPECIALIZACIÓN CELULAR

En la mayoría de los organismos pluricelulares aparecen tejidos originados por diferenciación y especialización de las células.

**En los animales superiores** y, tomando como ejemplo el hombre, todas las células se originan a partir de una sola: el huevo fecundado (diploide, con **2n** cromosomas, **n** procedentes de un progenitor y **n** del otro). Durante el desarrollo embrionario se va dividiendo y las células se van diferenciando especializándose para formar los tejidos (apartado anterior). Los principales tejidos son: *epitelial*, *conjuntivo*, *óseo*, *cartilaginoso*, *muscular* y *nervioso* con gran cantidad de tipos celulares.

Recordad que los animales se clasifican en dos grandes grupos: los Protozoos (unicelulares) y los Metazoos (pluricelulares). Los Metazoos a su vez pueden ser Invertebrados, que poseen tejidos más o menos diferenciados dependiendo de su grado de evolución y los Vertebrados que poseen tejidos similares a los de hombre.

En los **vegetales** los individuos se pueden desarrollar a también a partir de un huevo o cigoto, pero los ciclos biológicos son más complicados (ver meosis) y en muchas ocasiones hay individuos haploides (con **n** cromosomas) que no se forman a partir de un huevo fecundado, sino a partir de una espora haploide. En cualquier caso se produce también la diferenciación y especialización de las células para formar tejidos, al menos en los **vegetales superiores**: tejidos *absorbentes* (especializados en la captación del agua del sustrato), tejidos *conductores* como el *xilema* y el *floema* (encargados de la distribución del agua por el vegetal), tejidos de *sostén* como el *colénquima* y el *esclerénquima* (dan solidez al vegetal y el permiten mantenerse erguido fuera del agua) y tejidos *epidérmicos* que protegen superficialmente y limitan las pérdidas de agua.

En los vegetales se distinguen tres niveles de organización dependiendo de su grado de evolución y de la presencia o no de tejidos:

Nivel **protófito** (protos= primera, fiton= planta). La unidad morfológica y fisiológica es unicelular. La única célula realiza funciones vegetativas y reproductoras al dividirse por mitosis. A veces las células se agrupan entre sí por medio de mucílagos, pero no llegan a tener relaciones fisiológicas. Son las algas azules (cianobacterias, que además son procariontes), las diatomeas, algunas algas verdes y ciertos hongos.

Nivel **talófito**. Son vegetales pluricelulares cuyas células constituyen una unidad fisiológica porque están relacionadas entre sí. Esa unidad fisiológica es el talo. Pero los talófitos son totalmente dependientes del agua o de una atmósfera saturada de humedad, porque carecen de tejidos especializados capaces de regular el contenido hídrico. En los más primitivos todas las células realizan funciones vegetativas y de reproducción, pero en los más evolucionados aparecen grupos de células con dos funciones, unas se dedican a realizar la fotosíntesis y almacenar reservas (funciones vegetativas) y otras a la reproducción.

Son las algas rojas, las pardas, muchas verdes, gran parte de los hongos y los Briophyots (Musgos y Hepáticas), si bien en este grupo ya se observa cierta diferenciación de tejidos.

Nivel **traqueófito** o **cormófito**. Los vegetales que alcanzan este nivel son capaces de vivir en el medio aéreo y son solo parcialmente dependientes del agua. Pueden mantener y retener el agua en su cuerpo vegetativo, porque adquieren los tejidos especializados citados antes: tejidos *absorbentes* (especializados en la captación del agua del sustrato), tejidos *conductores* como el *xilema* y el *floema* (encargados de la distribución del agua por el vegetal), tejidos de *sostén* como el *colénquima* y el *esclerénquima* (dan solidez al vegetal y el permiten mantenerse erguido fuera del agua) y tejidos *epidérmicos* que protegen superficialmente y limitan las pérdidas de agua.

Son traqueófitos los Pteridophyots (helechos) y las Spermatophyots (Gimnospermas y Angiospermas).

## TIPOS DE ORGANIZACIÓN EN LOS SERES VIVOS

Repasar la clasificación de los seres vivos que se os dio en la Introducción a la Biología de principios de curso.

**SERES ACELULARES. VIRUS.** Como decimos son organismos acelulares (no son células). Consisten únicamente en un filamento de ácido nucleico que puede ser DNA o RNA, y una cápsula de naturaleza proteínica.

### SERES CELULARES

**PROCARIONTES:** seres vivos con células procariontes (sin verdadero núcleo). Tienen una región nuclear en la que se encuentra el DNA. Son las **bacterias, las cianofíceas y los mycoplasmas.**

**EUCARIONTES:** tienen verdadero núcleo. En él se aloja el DNA. Son **todos los animales y todos los vegetales** a excepción de las cianofíceas.

\*Atención: procarionte y eucariontes son siempre sustantivos. Procarionte y eucariota pueden ser sustantivos o adjetivos. No se puede decir “los seres eucariontes”, solo “los eucariontes.

## MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS CÉLULAS

### ESTUDIO MICROSCÓPICO

#### TIPOS DE MICROSCOPIOS: LÍMITE DE RESOLUCION

En citología se estudian formaciones de tamaño muy variado. Por ejemplo: el diámetro de una mitocondria es de 0,5 micras. Muchas bacterias tienen una micra de largo y una célula de mamífero, como el hombre, oscila entre 5 y 50 micras. Cualquier célula animal, en general, tiene un tamaño de 10 a 20 micras. Las células vegetales suelen ser mayores. Para el estudio de todas estas células se ha usado tradicionalmente el microscopio:

**Microscopio óptico** (de luz): usa luz visible (blanca).

**Microscopio electrónico:** utiliza una radiación de electrones para "iluminar" los objetos. Puede ser de dos tipos:

- de transmisión (TEM, de Transmission Electron Microscope).
- de barrido (SEM, de Scanning Electron Microscope)

**El MO** (microscopios óptico o de luz), consta de:

Un sistema de lentes, ocular (generalmente x10) y tres o cuatro objetivos (x4, x10, x40 y x100).

Una platina para colocar los portos, con pinzas o nonius.

Una fuente de luz con condensador y diafragma.

Un sistema de enfoque (micrométrico y macrométrico)

El **TEM** es un microscopio de mayor tamaño que el óptico. La fuente de iluminación es un filamento (suele ser de tungsteno) o cátodo situado en la parte superior de una columna cilíndrica de unos 2 m de altura que emite electrones, en esa columna se hace el vacío para que el aire no disperse los electrones. Los electrones son acelerados y obligados a formar un haz que se dirige a la parte inferior de la columna hacia la muestra a estudiar. Las regiones densas (en las que hay gran densidad de átomos de la célula) no permiten ser atravesadas por los electrones y aparecen como zonas oscuras o **densas a los electrones** en la pantalla de televisión en la que se ve la imagen.

El **SEM** suele ser más sencillo y más pequeño que el TEM. En este caso los electrones no atraviesan la muestra sino que inciden sobre su superficie. Ello permite tener imágenes tridimensionales de las estructuras.

Como vemos, los microscopios son un sistema de lentes de amplificación que permiten al ojo humano ver estructuras que sin ellos no se podrían ver.

Se llama "**poder de resolución**" a la capacidad que tiene el ojo humano, solo o ayudado por aparatos, para distinguir dos objetos muy próximos.

El límite de resolución del ojo humano desnudo es de 0,2 mm.

" " del Microscopio de Luz es de 0,2  $\mu\text{m}$ . (0,2-1,1  $\mu\text{m}$ ).

" " " Electrónico es de 2,5  $\text{\AA}$  (1  $\text{\AA}$  -10  $\text{\AA}$ )

El límite de resolución depende de la luz con la que se iluminan los objetos. Se ha demostrado que **dos objetos muy próximos solo pueden observarse como distintos cuando la distancia entre ellos es mayor que la mitad de la longitud de onda de la luz empleada.**

\* Ejercicio:

La longitud de onda de la luz blanca es de 550 nm. Sabiendo que el microscopio óptico funciona con luz blanca, ¿cuál es su límite de resolución?

El microscopio electrónico se introdujo entre la década de los 40 y los 50, y funciona con electrones. Los electrones pueden considerarse como una variedad de radiación de pequeñísima longitud de onda. Esto permite que su límite de resolución esté entre 1 y 5 Å. Se suele decir de 2,5 Å, es decir, unas 100 veces mayor que el microscopio óptico. El microscopio electrónico permite distinguir incluso macromoléculas. Por ejemplo: una proteína puede tener entre 50 y 100 Å.

Los límites del poder de resolución establecen los límites de amplificación. La **amplificación** se refiere al tamaño aparente de los objetos. La **resolución** se refiere a la nitidez de la imagen. Las imágenes microscópicas pueden ampliarse casi sin límites por medios ópticos o fotográficos, pero a partir de cierto punto la imagen es cada vez más borrosa y no se consigue nada con la amplificación.

Solución al ejercicio de la página anterior:  $550/2=275\text{nm}$  Al menos debe ser 275 nm, es decir, de 0,275  $\mu\text{m}$ .

## **PREPARACIÓN DE MUESTRAS: TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

Antes de su observación al microscopio los materiales deber ser preparados. Describimos unas técnicas estandarizadas, aunque luego cada material biológico tiene su técnica específica.

### **Microscopio de Luz.**

#### **1. Fijación.**

La fijación consiste en la utilización de distintas sustancias que precipitan las macromoléculas. Se emplea el formol o el glutaraldehído para el microscopio óptico. Se trata de matar las células pero conservando las estructuras.

2. **Embebido** en sustancias duras. Una vez fijado se hace lo siguiente: el material se deshidrata y se empapa en **cera de parafina derretida** que se endurece cuando se enfría. Luego el tejido incluido en sustancias duras se secciona con microtomos que poseen **navajas de acero** y que permiten cortes de 2 a 10 micras de espesor. A veces, en vez de incluirse en parafina se congelan y se seccionan las muestras congeladas, pero la congelación produce daño tisular.

Estos cortes se montan en el **portaobjetos**.

3. **Tinción**. se tiñen con colorantes adecuados, a veces selectivos para un tipo de orgánulo o de sustancia. Por ejemplo, la **hematosilina eosina** es una tinción específica para el DNA (es un colorante básico). Se observa al microscopio tras ponerle (montar el cubre) el **cubreobjetos**.

A veces se sellan las preparaciones (los cubres) para facilitar su conservación.

## Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

### 1. Fijación.

La fijación consiste en la utilización de distintas sustancias que precipitan las macromoléculas. Para el microscopio electrónico se emplea el tetraóxido de osmio, que reacciona con lípidos y otros componentes pero no se sabe bien cómo actúa.

2. **Embebido.** Para el microscopio electrónico los cortes han de ser mucho más finos para que puedan ser atravesados por los electrones. Además no se pueden emplear vidrios porque detienen totalmente los electrones. Entonces, una vez fijados los tejidos, se incluyen en plásticos no polimerizados que se polimerizan mediante un catalizador. Estos plásticos permiten obtener cortes de 500 a 1000 Angstroms (Å) de espesor. Se emplean cuchillas finas de vidrio o de diamante. En lugar de montarse sobre portaobjetos de vidrio se montan sobre mallas metálicas y la observación se hace en los agujeros de la malla.

3. **Tinción.** Para la tinción al microscopio electrónico no se emplean colorantes sino soluciones que contienen átomos pesados como plomo, uranio. Estos átomos se combinan con grupos químicos de ciertas estructuras celulares e impiden el paso de electrones en mayor o menor medida de modo que las zonas "teñidas" aparecen más oscuras que las zonas no "teñidas". Por convección en microscopía electrónica se dice que una formación **oscura** es **densa u opaca a los electrones (osmiófila)** y quiere decir que hay una gran densidad de moléculas.

## Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

La microscopía de barrido permite una observación de superficie en muestras relativamente gruesas. La muestra se fija, se seca y se recubre de una capa delgada de un metal conductor (oro, paladio, o carbono que también conduce en caliente). El SEM da una gran profundidad de campo, pero no permite ver el interior de las células o de las estructuras. No se suelen emplear aumentos de más de x20000, porque la resolución no es muy elevada.

## PREPARACIÓN DE FRACCIONES CELULARES (FRACCIONAMIENTO CELULAR). CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL

Es una técnica muy importante y muy útil para el estudio de los orgánulos celulares.

Primero se **homoginizan** las células rompiéndolas en medios que preserven los orgánulos. Luego se separan los orgánulos por **centrifugación selectiva**.

Generalmente, las células se rompen sumergiéndose en disoluciones de sacarosa o de otros azúcares que sean **hipotónicas** respecto al medio intracelular (Choque hipotónico).

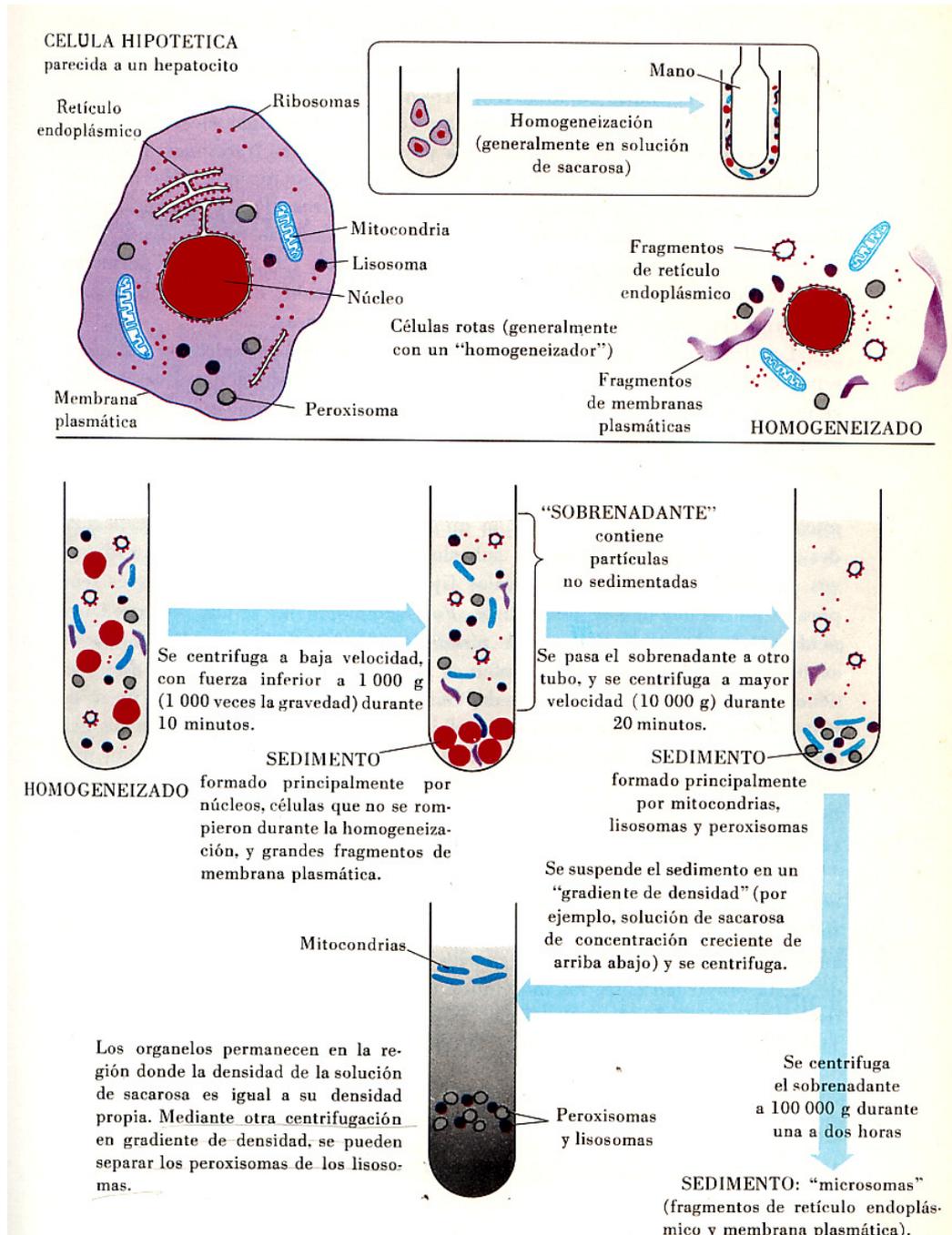
Muchos orgánulos como las mitocondrias, los cloroplastos o los núcleos no resultan dañados.

El retículo endoplasmático, que son cavidades limitadas por membranas, se rompe en fragmentos y tiende a formar vesículas esféricas (microsomas).

La membrana plasmática también se rompe en fragmentos de tamaño variable.

Cuando se somete a estos homogeneizados a centrifugación diferencial en un campo gravitacional las distintas partículas se van a mover a mayor o menor velocidad dependiendo de su tamaño, de su densidad y de su forma. Se hace una centrifugación diferencial sometiendo a la suspensión de orgánulos a fuerzas de la gravedad progresivamente mayores.

Ejemplo:



1. Tubo de ensayo con orgánulos completos: mitocondrias, núcleos, ribosomas, RER, fragmentos de membranas, lisosomas, peroxisomas etc.

Centrifugamos a 1000 g durante 10 minutos.

2. Se forma un precipitado que contiene núcleos, fragmentos grandes de membrana plasmática y algunas mitocondrias. En el sobrenadante se encuentran orgánulos más pequeños, como peroxisomas y de mitocondrias.

Centrifugamos a 10000 g durante 20 minutos.

3. Se forma un precipitado de lisosomas peroxisomas y mitocondrias y un sobrenadante.

Centrifugamos a 100000 g durante 1 ó 2 horas.

4. Obtenemos un precipitado de microsomas y fragmentos de RE. En el sobrenadante tendríamos ribosomas libres (no unidos a membranas) y moléculas solubles.

Para lograr precipitar orgánulos más pequeños como los ribosomas tendríamos que centrifugar a más de 100000 g durante mucho tiempo o bien se puede suspender ese sobrenadante o cualquiera de los precipitados anteriores en un gradiente de densidad. Por ejemplo: una disolución de sacarosa de concentración creciente de abajo a arriba. Los orgánulos se sitúan en el nivel del tubo en el cual la densidad de la solución es parecida a la suya propia. Esto permite separar orgánulos de similar forma y tamaño pero de distinta densidad.

## LOCALIZACIÓN DE MOLÉCULAS CELULARES

### **RADIOAUTOGRAFÍA.**

Es muy útil para el estudio de fenómenos intracelulares.

Consiste en **convertir en radiactivas** por incorporación de átomos radiactivos **pequeñas moléculas** que la célula utilizará como precursores para formar macromoléculas. El isótopo más utilizado es el tritio, H3, variedad radiactiva del hidrógeno. También se usa el C14, el P32, y el S35.

Uno de los precursores radiactivo más usado ha sido la **timidina tritiada** (timina + desoxirribosa) que se ha hecho radiactiva por sustitución de algunos átomos de Hidrógeno por otros de tritio. Lógicamente se ha empleado en el estudio del DNA.

Este precursor se le presenta a las células, se cultivan con él, y luego éstas se fijan a intervalos conocidos. Se cortan y los cortes se cubren con una emulsión o película fotográfica. Cuando se expone a la luz una película fotográfica y luego se revela se reducen las sales metálicas de la película y aparecen granos de plata metálica, que constituyen el negativo de la película. De igual manera una película expuesta a radiactividad y revelada después presenta granos de plata en la emulsión radioautográfica. Al microscopio se ven simultáneamente la célula y los granos de plata de la emulsión.

Por ejemplo, si se dan precursores radiactivos de RNA, como la **uridina tritiada**, a los pocos minutos toda la radiactividad se encuentra en el núcleo. Si se fija 1 ó 2 horas después de la exposición a la uridina tritiada, cada vez aparece más radiactividad en el citoplasma, con lo cual queda probado que el RNA se forma en el núcleo y luego emigra al citoplasma.

Para interpretar correctamente las radioautografías se deben conocer o sospechas las vías metabólicas implicadas y además se emplean preparaciones testigo. Por ej, a una parte de las muestras expuestas a precursores radiactivos de RNA se les añade RNAasa purificada, que desdobra al RNA eliminándolo de los tejidos. Si este tratamiento suprime la radiactividad (no se producen granitos de Ag en la emulsión), se concluye que el precursor radiactivo se incorpora al RNA.

### **HISTOINMUNOLOGÍA.**

Como sabemos, los anticuerpos son proteínas producidas por los vertebrados como defensa contra las infecciones. Son producidos en millones de formas deferentes cada una de las cuales tiene un lugar de unión que reconoce específicamente a una molécula diana de nominada antígeno.

Si se marcan los anticuerpos con **colorantes fluorescentes** resultan muy valiosos para localizar en las células determinadas moléculas mediante la llamada **microscopía de fluorescencia**. También se pueden marcar con partículas densas a los electrones (como oro coloidal) para la localización de moléculas el microscopio electrónico.

Este mecanismo junto con métodos de amplificación de la señal (por ejemplo uniendo al complejo Ag-Ac otros anticuerpos secundarios) permite detectar pequeñas cantidades de antígenos.

Los test ELISA (de Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay) que se emplea para detectar varios tipos de infecciones, entre ellas la causada por el VIH, son técnicas desarrolladas sobre este fundamento de la reacción Ag-Ac.

## **TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE**

En principio el término de **DNA recombinante** se empleaba para definir una molécula de DNA construida *in vitro* a partir de DNA proveniente de dos o más organismos. Hoy en día este término se aplica a todo material genético (también puede ser RNA) que es manipulado *in vitro*.

Más adelante, en el tema V (Las bases químicas de la herencia), en el punto 5 (“Técnicas utilizadas en Ingeniería genética para transferir un gen de una especie a otra”) volveremos a hablar de los métodos que se utilizan para conseguir insertar un fragmento de DNA de una especie en el genoma de otra. Ahora solo adelantamos el concepto como un método más de estudio de la composición y los procesos celulares.

Clonar significa hacer copias idénticas. En este caso se hacen copias idénticas, pero en un organismo distinto al organismo original que poseía el gen.

La clonación del DNA comporta la separación de un gen específico o un fragmento de DNA de su cromosoma (que es mucho mayor) y la unión a una pequeña molécula de DNA portador para replicar este DNA modificado miles o millones de veces. El resultado es una amplificación de un gen o de un fragmento de DNA. Posteriormente este gen se expresará en forma de una proteína recombinante.

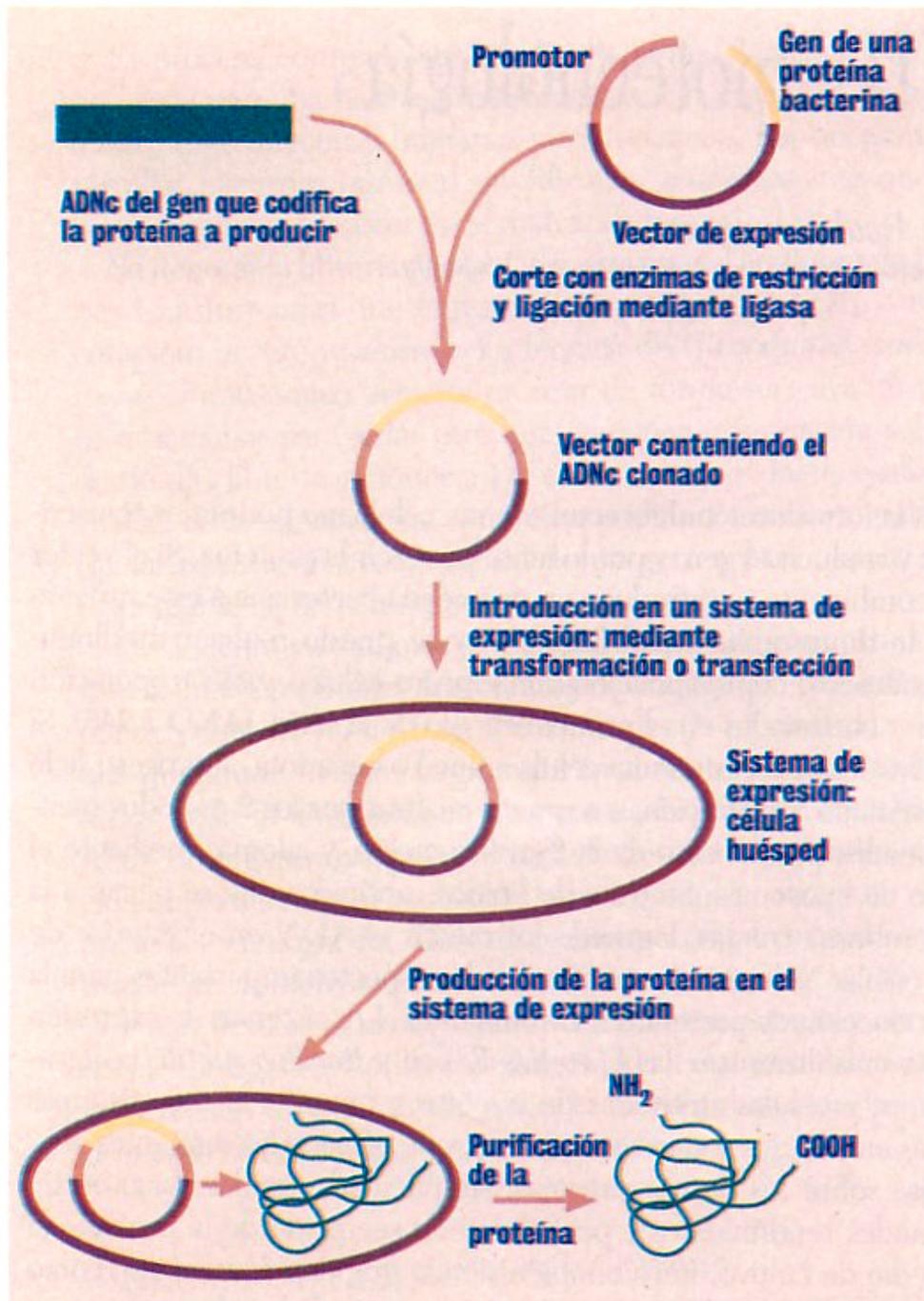
La clonación de un fragmento de DNA, procariótico o eucariótico se lleva a cabo mediante 5 procedimientos generales:

1. Un método para cortar el DNA en una región precisa. Esto se ha conseguido con el descubrimiento de endonucleasas específicas de secuencia (*endonucleasas o enzimas de restricción*), que son las tijeras moleculares necesarias.

La primera *endonucleasa de restricción* fue aislada en 1970 por Hamilton Smith, a partir de extractos de una bacteria llamada *Haemophilus influenzae*. Actualmente se conocen unas 150 que cortan el DNA de una manera específica y reproducible. Suelen reconocer secuencias específicas de 4-8 nucleótidos, algunas reconocen secuencias muy frecuente y cortan el DNA en muchos fragmentos pequeños, otras reconocen secuencias muy raras y cortan el DNA en pocos fragmentos muy grandes.

2. Un método para unir covalentemente dos fragmentos de DNA. Las *DNA ligasas* son las encargadas de hacerlo.
3. Selección de una molécula de DNA portadora, capaz de autorreplicarse **para que actúe como DNA portador**. Suelen ser **plásmidos bacterianos** (pequeños fragmentos de DNA bacterianos, distintos del cromosoma bacteriano) **o DNAs víricos** (que pasan a ser llamados **vectores de clonación**), a los que se unen las moléculas de DNA que se quieren clonar. Las nuevas moléculas de DNA que contienen segmentos procedentes de otras fuentes reciben el nombre de **DNA recombinantes**.
4. Un método para trasladar el DNA desde el tubo de ensayo a una **célula hospedera** que ofrece la maquinaria enzimática necesaria para la replicación de ese DNA. Esta célula va a producir la proteína (proteína recombinante) que codifica el gen clonado (va a permitir la **expresión del gen**). Se suelen utilizar como células hospederas las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, las levaduras (hongos unicelulares) y células cultivadas de insectos y mamíferos. Los sistemas bacterianos son los métodos más utilizados.
5. Métodos para seleccionar o identificar aquellas células hospederas que contienen el DNA recombinante.

El procedimiento para la obtención de una proteína recombinante se esquematiza a continuación:



**Figura 1** Procedimiento para la obtención de una proteína recombinante

**Transformación:** introducción del DNA (del gen) en una bacteria.

**Transfección:** introducción del DNA (del gen) en una célula eucariota (por ejemplo en una levadura).

## **Ejemplos de producción de proteínas recombinantes, de aplicación en Medicina**

**Insulina:** fue la primera proteína comercial creada de manera recombinante. Se produce en un sistema de expresión bacteriano. Se usa, como sabemos para tratar la diabetes.

**Hormona del crecimiento:** anteriormente era extraída de cadáveres para tratar a niños con déficit en esta hormona (enanismo hipofisario). A veces se producía muerte de los niños por contaminación con virus mortales. Su producción de forma recombinante en un sistema de expresión bacteriano produjo seguridad y abundancia del producto.

**Vacunas contra enfermedades infecciosas:** antes de la tecnología del DNA recombinante todas las vacunas estaban formadas por microorganismos inactivados (bacterias o virus muertos) o atenuados (bacterias o virus modificados para que no puedan multiplicarse en el organismo inoculado). Siempre había un peligro de infección. Actualmente se producen de forma recombinante únicamente proteínas de la superficie del agente infeccioso (por ejemplo, de la envoltura vírica) que son igual de eficaces para inducir la respuesta del sistema inmunitario, pero más seguras. La primera vacuna desarrollada de forma recombinante en levaduras fue contra el **virus de la Hepatitis B**. Actualmente hay muchas en estudio, sobre todo se está tratando de obtener proteínas recombinantes correspondientes a proteínas de la superficie del **virus del sida**.

**Anticoagulantes y factores sanguíneos.** Son producidos en cultivos de células de mamíferos. De momento es un proceso caro y lento. Se han obtenido de esta manera el **activador del plasminógeno de tejidos** (que activa la plasmina, un enzima implicado en la disolución de coágulos, se emplea en el tratamiento de víctimas de ataques de corazón), y el **factor VIII** (que promueve la coagulación y se emplea para el tratamiento de pacientes hemofílicos, eliminando el riesgo de las transfusiones).

**Factores de estimulación del sistema inmunitario:** estimulan la producción de leucocitos. Se emplean para tratar deficiencias del sistema inmunitario y combatir infecciones.

**Eritropoyetina:** estimula la producción de eritrocitos. Se utiliza para tratar anemia en pacientes con enfermedades del riñón.

**Interferones:** utilizados para combatir las infecciones víricas y el tratamiento de algunos cánceres.

**Interleuquinas:** activan y estimulan distintos tipos de leucocitos. Se emplean para curas de heridas, infecciones por VIH, cáncer e inmunodeficiencias.

**Anticuerpos monoclonales:** como sabemos, los anticuerpos son proteínas selectivas que pueden unirse a una determinada diana entre millones. Mediante la tecnología del DNA recombinante se ha conseguido clonar anticuerpos, generalmente en bacterias, que reconocen un determinado antígeno. Esta extraordinaria especificidad hace que sean usados en muchas pruebas de diagnóstico.

Además, los investigadores intentan aprovechar esta especificidad de los anticuerpos para el transporte de fármacos selectivos, toxinas o compuestos radiactivos a los tumores, (así se conseguiría únicamente la muerte células tumorales) o bien a células infectadas por agentes infecciosos.

**Mullis, Kary** (1944 - ), biólogo molecular y premio Nobel estadounidense que desarrolló la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), una técnica que genera copias de DNA. Esta innovación tuvo una importancia decisiva en la gran expansión de la biología molecular a mediados de la década de 1980. Se ha aplicado de forma amplia en el campo de la biología, tanto para analizar el DNA de muy diversos organismos vivos como para detectar la presencia de pequeñas cantidades de DNA en los fluidos corporales con fines diagnósticos (por ejemplo, DNA vírico en muestras de sangre humana).

Mullis obtuvo el doctorado en bioquímica por la Universidad de California en 1973. En 1986, publicó un trabajo en el que explicaba cómo se pueden replicar rápida y repetidamente secuencias cortas y específicas de DNA. Para emplear la técnica PCR, la doble hélice del DNA objetivo, se desnaturaliza mediante temperaturas muy elevadas para obtener cadenas sencillas de DNA (el DNA plantilla). A continuación se unen dos secuencias muy cortas (oligonucleótidos) de DNA artificial de una sola hélice a la plantilla de DNA. La clave de la técnica es que estos oligonucleótidos están diseñados para unirse al extremo de cada una de las cadenas complementarias de DNA, que constituían en conjunto el DNA objetivo de cadena doble. Estas dos cadenas de DNA son replicadas entonces de forma independiente entre los oligonucleótidos por acción del enzima DNA polimerasa, duplicando el número de copias de cada secuencia plantilla disponible. El proceso de desnaturalización por el calor, unión de los oligonucleótidos y síntesis de DNA se repite una serie de veces, lo que da lugar a una multiplicación masiva del DNA objetivo. En 1993 Mullis fue galardonado con el Premio Nobel de Química por este trabajo.