

Tema 26. Métodos de estudio de la célula. Células procariotas y eucariotas. La célula animal y vegetal. Formas acelulares.

- 1º Bach. Bloque 6. Formas de organización de los seres vivos.
- 2º Bach. (Biología). Bloque 3. La célula y la base físico-química de la vida.

SUMARIO

26.1. Métodos de estudio de la célula.

26.1.1. El microscopio óptico o fotónico

26.1.2. La imagen del microscopio. Poder de resolución

26.1.3. Preparaciones microscópicas

A) Montaje de preparaciones temporales o frescas.

B) Montaje de preparaciones permanentes.

26.1.4. Preparaciones microscópicas de células vegetales

26.1.5. Preparaciones microscópicas de células animales

26.1.6. Microscopio Ultravioleta

26.1.7. Microscopio de contraste de fases

26.1.7. Microscopio de interferencia

26.1.8. Microscopio de polarización

26.2. El microscopio electrónico (resumen)

26.3. Otros métodos de investigación citológica

- **Estudios bioquímicos de las células.**
- **Métodos de seguimiento radiactivo.**
- **Métodos de estudio fisiológicos**
- **Técnicas para el estudio del contenido químico de la célula**
- **Inmunocitoquímica**

26.4. Niveles de organización celular: procariotas y eucariotas.

26.5. Morfología de la célula eucariota

26.5.1. Evolución celular: Teoría de la endosimbiosis

26.5.2. Forma y tamaño de las células animales y vegetales

26.5.3. Semejanzas y diferencias

26.6. Fisiología celular

26.6.1. Funciones de nutrición

26.6.2. Funciones de relación

26.6.3. Funciones de reproducción

26.7. Formas acelulares.

www.elttemario.com

26.1. Métodos de estudio de la célula.

Entendemos que este apartado se refiere a los métodos de estudio de la célula accesibles a los alumnos, más que a una exhaustiva descripción de los métodos que son propios de especialistas en Citología e Histología. Como tal planteamos su desarrollo.

Las unidades de longitud utilizadas en bioquímica y microscopía en el Sistema Internacional, son: milímetro; micrómetro ($\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$) antes llamado micra (μ); nanómetro ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$) antes llamado milimicra ($\text{m}\mu$); el Angstrom ($\text{\AA} = 0,1 \text{ nm}$).

El ojo humano posee un poder de resolución de más o menos $0,1 \text{ mm}$, es decir 100μ (o micrómetros). La mayoría de las células eucarióticas miden entre 10 y 30μ (unas 3 ó 10 veces menos que el poder de resolución del ojo), y las células procarióticas aún son menores. Para distinguir células individuales, no hablemos de examinar estructuras, hay que apelar a instrumentos que posean un poder de resolución mayor.

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la estructura celular se obtuvo con la ayuda de tres tipos de instrumentos: el microscopio óptico o fotónico, el microscopio electrónico de transmisión y el microscopio electrónico de barrido.

26.1.1. El microscopio óptico o fotónico

Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) construyó uno de los primeros microscopios, de unos 240 aumentos, con el cual consiguió ser el primer observador de microorganismos de la historia. Este aparato era un microscopio simple, que contaba de una sola lente convexa.

Robert Hooke y los demás pioneros de la Teoría celular, utilizaron ya el **microscopio compuesto**, que combina dos juegos de lentes convexas (objetivo y ocular) y que pasamos a describir.

Se trata de un instrumento fundamental en el estudio de la Biología. Dado que la célula es la unidad de vida y que su tamaño (así como el de su estructura) es normalmente inaccesible al poder de resolución de la vista, necesitamos de aparatos aumenten su tamaño hasta hacerla visible.

Para lograr pequeños aumentos nos servimos de las lupas, que podemos considerar como sencillos microscopios. Son lentes biconvexas. Las más sencillas son las llamadas lupas de mano; también existen **lupas binoculares** de gran campo visual que permiten la visión estereoscópica, es decir en relieve. Todas las lupas dan imágenes "a derechas" lo que facilita la manipulación que se realiza bajo su campo.

Para lograr mayores aumentos se utiliza el microscopio. En realidad debería llamarse microscopio compuesto dado que emplea dos sistemas de lentes separados por un tubo oscuro. El calificativo de **óptico o fotónico** se debe a que es el ojo humano el encargado de recibir la imagen aumentada por aquel y que la radiación empleada es la luz.

Una descripción minuciosa del microscopio y de sus accesorios rebasaría los límites de este tema. No obstante creemos que es importante que los alumnos conozcan los principios básicos de la microscopía, sus técnicas primordiales y que sepan emplear y manipular correctamente este instrumento.

PARTES DEL MICROSCOPIO

Cabe distinguir tres partes: soporte o estativo, las lentes y los accesorios para la iluminación:

El **soporte o estativo** se compone de un pie pesado, en forma de U o de V, que sirve de apoyo y da estabilidad al microscopio. De él parte un brazo que a su vez soporta el tubo y la platina. La **platina** es una placa plana, compacta, con un orificio en su centro, sobre el que se coloca el objeto que se va a examinar. Éste puede ser mayor o menor, bien por un dispositivo en "iris" comúnmente utilizado en aparatos fotográficos, o por un "**diafragma** revolver" que consiste en un disco giratorio, perforado por varios orificios de distinto diámetro y colocado excéntricamente de modo que, al girarlo, coincide con el campo de la iluminación el orificio deseado que deja pasar la luz precisa. La platina puede ser fija o móvil.

El **tubo**, como indica su nombre, es una pieza hueca cuyo extremo superior soporta una lente (**ocular**) y en el inferior otra (**objetivo**) o, más frecuentemente, un portaobjetivos (**revólver**) con varios y que, mediante un mecanismo giratorio, hace coincidir con el extremo inferior del tubo la lente de aumento adecuado o deseada.

Para el correcto enfoque del objeto a observar, que se traduce en una aproximación de éste al objetivo hay dos mecanismos según los modelos del mercado. En uno, el tubo se desliza sobre el brazo gracias a un sistema de cremallera y piñón, por lo cual se aproxima o aleja del objeto a examinar. En otros es la platina la que realiza este movimiento alejando o aproximando el objeto al objetivo. Dichos movimientos en ambos casos se controlan mediante una cabeza de tornillo estriada (**tornillo macrométrico**). Para movimientos lentos de poco trayecto, existe el **tornillo micrométrico**. Éste puede faltar, y si existe se halla o separado del macrométrico o sobre él.

Las **lentes** son dos: objetivo y ocular. El **objetivo** es la más próxima al objeto que se examina. Es un pequeño tubo que contienen varias lentes combinadas que actúan como una sola convergente. En su parte externa está grabada la distancia focal y los aumentos (ej. 16 mm. / 4 x, es decir distancia focal de 16 mm. y 4 aumentos). Si el microscopio dispone de revolver con tres o cuatro objetivos, éstos se ordenan de menor a mayor aumento al girar el revolver en el sentido de los agujas del reloj. Para utilizar el objetivo de 2 mm. de distancia focal (de **inmersión**), se coloca sobre el **cubreobjetos** una gota de aceite especial y, al poner dicho objetivo, queda inmerso en el aceite enfocándose en esta posición.

El **ocular** también es un corto tubo en cuyos extremos lleva dos lentes que también actúan como una sola: la superior es la lente ocular propiamente dicha y la inferior la lente del campo, que corrige las observaciones, aclara el campo y aumenta el objeto. Existen oculares con una escala graduada en un cristal, situado entre las dos lentes de un ocular ordinario, que permite medir lo observado.

Tanto el objetivo como el ocular se encuentran formados por un sistema de varias lentes para corregir las posibles aberraciones cromáticas.

Accesorios de iluminación En el pie se halla un **espejo** giratorio (cóncavo por una cara y plano por la otra), que dirige un haz de luz reflejada al orificio de la platina. Casi siempre se utiliza la cara cóncava, si el microscopio tiene **condensador** se utiliza la cara plana. Los modelos que llevan luz incorporada en el pie, carecen de espejo.

El condensador es una pieza con varias lentes que concentran la luz sobre el objeto a examinar. Se logra acercándolo o alejándolo de la platina. Cuando se trabaja con luz artificial es conveniente colocar un disco de cristal azul, que elimina las radiaciones amarillas. No obstante conviene utilizar bombillas azules.

En muchos microscopios la abertura del orificio de la platina es constante y debajo o en medio del condensador es donde se encuentra el **iris o diafragma**.

Hay varios tipos especiales de microscopios ópticos. Uno de ellos es el microscopio de fluorescencia, que permite localizar en las células determinadas moléculas empleando dos colorantes específicos: la fluoresceína, que da color verde y la rodamina, color rojo.

26.1.2. La imagen del microscopio. Poder de resolución

Con el microscopio se obtienen **imágenes mayores, virtuales e invertidas**, de manera que el lado derecho del objeto observado aparecerá a la izquierda en la imagen y el lado superior de aquél se ve en la parte inferior de éste.

La **amplificación** total obtenida en un microscopio se calcula multiplicando la ampliación inicial del objetivo empleado, por la del ocular; ambas impresas en los correspondientes tubos.

El **poder de resolución** es la capacidad de presentar distintos y separados dos puntos adyacentes colocados a una distancia mínima. Dicha distancia mínima es el poder de resolución. Esto quiere decir que si dos estructuras o puntos se hallan separados por una distancia menor que la del poder de resolución, las veremos como una sola, no como dos imágenes distintas. El poder de resolución (RP), se calcula así:

$$R.P = \frac{0,61\lambda}{2AN}$$

λ = longitud de onda AN = apertura numérica AN = $n \sin \alpha/2$, n = índice de refracción del medio; α = ángulo del cono de luz
0'61 = constante relacionada con el grado de superposición que pueden tener dos puntos próximos para que los pueda distinguir el ojo humano.

Ej. Usando luz azul ($\lambda = 400 \text{ nm}$) y dado que el aceite de inmersión tiene un valor máximo de $n = 1.4$, y si α es de casi 180° (dada la proximidad de la preparación) el poder de resolución es de $0.17 \mu\text{m}$. Si λ vale 550 nm , el $R/P = 0.25 \mu\text{m}$. Cuanto menor es el R/P , mejora la calidad de la observación.

26.1.3. Preparaciones microscópicas

El objeto que ha de examinarse al microscopio se coloca en un **portaobjetos** (prisma rectangular de $76 \times 26 \times 1 \text{ mm}$. aproximadamente), rodeado de un líquido transparente, solidificado o no, y se cubre en la mayoría de los casos con una laminilla de vidrio cuadrada o circular de 0.1 ó 0.2 mm . de espesor (**cubreobjetos**). La preparación es el conjunto formado por el objeto, el "porta" y el "cubre".

El objeto que se va a observar ha de ser de un tamaño ínfimo por lo que, si no es de por sí tan pequeño, es necesario disociarlo y observar una parte del mismo. Para ello se utilizan dos métodos: la **dilaceración** o disociación en porciones más pequeñas mediante agujas enmangadas o trituración por diversos sistemas, y la realización de cortes muy finos que se realizan a mano alzada o con microtomos.

A) Montaje de preparaciones temporales o frescas.

El objeto a observar se sitúa sobre el porta rodeado de un líquido indiferentes (líquido intersticial, agua de charca, solución Ringer, Tyrode, etc.), evitando su desecación. Otras veces se emplea líquido clarificador que facilite la visión (glicerina, gelatina, lactofenol, etc.). Para el montaje se seguirá el siguiente esquema:

- 1) **Depositar sobre el porta:** Si el objeto es indeformable se sitúa sobre unas gotas del líquido indicado. Si el objeto tiende a enrollarse en ambiente seco, se deposita en un pocillo de agua, introducir en el mismo un porta apoyándose en el fondo y formando un plano inclinado. Con ayuda de una aguja enmangada deslizar el objeto sobre el porta procurando que quede estirado. A continuación se saca con las agujas y se deposita sobre papel de filtro, se le añade el líquido clarificador. A veces es necesario favorecer la adherencia (**fijación**), para lo que se utiliza calor, en caso de bacterias, levaduras o un adherente, en la mayoría de los casos albúmina de Mayer y calor.
- 2) **Colocar el cubreobjetos.** Cerca del objeto, colocar un cubre limpio cogido por los bordes con la mano izquierda y apoyado uno de sus lados sobre el porta formando un ángulo diedro. Con la aguja enmangada se mantiene el cubre y se va deslizando para que el cubre caiga de modo continuo sobre el objeto.
- 3) **Acabado.** Comprimir el cubre con la aguja enmangada para hacer salir por los bordes el exceso de líquido y burbujas de aire. En caso de quedar burbujas o no ocupar el líquido toda la superficie del cubre, se depositan algunas gotas del mismo en el borde. Antes de colocarlo sobre la platina se ha de procurar que todo esté bien seco.

Normalmente, para resaltar algunas estructuras del objeto a observar se debe teñir éste con colorantes indicados para ello. Se puede emplear un solo colorante (**tinción simple**) o varios (**tinción múltiple**). Hay colorante que permiten la vida del objeto a observar (rojo neutro), sin embargo la mayoría anulan los procesos vitales.

En este segundo caso el éxito de la tinción depende de una buena **fijación** (matar los tejidos o estructuras vivas a la vez que las fijan de modo que su forma histológica no se altere); se suelen utilizar como fijadores sustancias tales como alcohol, líquido de Bouin, ácido pícrico, ácido acético, etc.

Si se ha de teñir un objeto, con un solo colorante, el proceso a seguir es el siguiente:

- a) **Fijación.** Depositar el objeto a estudiar sobre un porta que a su vez se habrá colocado sobre una cubeta de tinciones. Cubrir el objeto con el líquido indicado, durante el tiempo oportuno.
- b) **Lavado.** Escurrir el líquido fijador y, con cuentagotas o pipeta, irrigar el objeto.
- c) **Tinción.** Cubrir el objeto con el colorante el tiempo marcado, evitando que se deseque.

- d) **Lavado.** Proceder como en b) hasta que el líquido de lavado salga sin teñir. No siempre es necesario este paso.
- e) **Montaje.** Proceder como se indico anteriormente.

B) Montaje de preparaciones permanentes.

Para conseguir preparaciones permanentes se utiliza un líquido que rodea el objeto prácticamente seco y que, al colocar el cubre, se solidifica. Se usa bálsamo del Canadá disuelto en xilol o bien Euparal. Otras veces consiste en bordear la preparación, para lo cual se aplica una cola o cemento o laca de uñas apropiado alrededor del cubre de modo que evite la desecación del montaje temporal antes practicado.

Dado el carácter básico de este tema hemos prescindido en la explicación de las preparaciones, del método de inclusión y endurecimiento previo a los cortes, por no emplearlo habitualmente con los alumnos. Por idéntico motivo no explicamos otros tipos de microscopios y de tinciones. A los alumnos debe indicársele, además, las precauciones lógicas en el uso del microscopio y el método experimental de proceder para la observación de las preparaciones.

26.1.4. Preparaciones microscópicas de células vegetales

La histología vegetal permite una serie de prácticas sencillas en las que los alumnos pueden realizar fácilmente la confección de preparaciones microscópicas para su posterior observación. Se pueden utilizar para su estudio tres procedimientos:

- a) **Dilaceración** manual o con pinzas. Basta desgarra un trozo y colocarlo entre porta y cubre con una gota de agua sin otra preparación o teñirlo, y observarlo al microscopio. Apropiado para separar epidermis, fibras, colénquimas, vasos en órganos tiernos.
- b) **Aplastamiento.** A veces precedido de dilaceración. Con él se pueden separar también vasos, colénquimas, esclereidas, columnas de parénquima, meristemos, etc. En estos últimos, (por ejemplo raíz de cebolla) pueden observarse mitosis, incluso sin tinción.
- c) **Cortes.** La pared de las células vegetales, su consistencia y tamaño celular, permiten que sean cortados por una simple hoja de afeitar, en secciones suficientemente finas, sin necesidad de microtomo. No obstante también pueden usarse microtomos de mano, aunque no suponen una considerable ventaja con respecto al uso de la cuchilla.
- d) **Tinción.** Para conocer la naturaleza de las paredes celulares se puede utilizar el verde brillante y carmín aluminico, no precisan fijación previa. La celulosa se tiñe de rosa o rojo, y las ligninas (suberina, cutina) de verde. También se puede utilizar hematoxilina-eosina. Para observación de figuras de mitosis (ej. raíz de cebolla) mediante Orceína.

26.1.5. Preparaciones microscópicas de células animales

Lo más indicado con los alumnos, en mayor media que para las preparaciones de células vegetales, es disponer de una adecuada colección de preparaciones. No obstante es posible y conveniente que los alumnos puedan realizar algunas, utilizando el material adecuado.

- a) **Método del raspado.** Es útil para estudiar células epiteliales. Ej. Raspando con suavidad la cara interna de la mejilla o la mucosa de algún animal, e incluso la humana. Basta colorear con azul de metileno.
- b) **Método de colocación simple** en el porta.
- Epitelial: epidermis de rana, branquias de mejillón.
 - Conjuntivo: extensión y posterior corte de un trozo de mesenterio de cualquier animal. Teñir con azul de metileno, o, previa fijación con ácido pícrico, con hematoxilina.
 - Músculo liso: Extensión de pared de vejiga urinaria de cualquier animal.
 - Hueso laminar: opérculo de sardina, o de su cintura escapular (se ven osteocitos y conductos calcóforos).

- c) **Método de dilaceración.** Idóneo para músculos estriados (tórax de moscarda o abeja, patas de cangrejo, patas de rana). Nervios: espinales de pez, o de algún mamífero o ave. Conjuntivo fibroso: Tendón de Aquiles de rana.
- d) **Método de extensión.** Fundamentalmente para sangre. Conviene utilizar preparaciones de colección.
- e) **Método de cortes.** Se procede de forma parecida a la indicada para las células vegetales. Hay que procurar que los cortes se hagan en cuña, y aprovechar sólo las partes más finas.
- Tejido adiposo y epitelial estratificado: se corta un poco de piel con un poco de tocino fresco. Teñir con Sudán III.
 - Cartilaginoso: Fina rodaja del extremo de un hueso largo de cualquier animal.
 - Nervioso. Hay que fijar previamente. Se puede utilizar sesos de cerdo, médula de buey, etc. obtenidos en carnicerías. Teñir con azul de metileno o hematoxilina. Sólo se pueden observar parte de las estructuras.

26.1.6. Microscopio Ultravioleta

Con luz ultravioleta de $200\text{ nm} < \lambda < 300\text{ nm}$, se puede observar hasta los cloroplastos y orgánulos de tamaño similar. Estos microscopios usan lentes de cuarzo. Presentan el inconveniente de que la luz UV produce lesiones oculares, por lo que no permite la observación directa, sino a través de fotografía; y no se pueden observar células vivas al alterar la composición molecular de las mismas. Da muy buenos resultados para técnicas de fluorescencia.

26.1.7. Microscopio de contraste de fases

La célula presenta una alta transparencia que dificulta su observación si no utilizamos una adecuada tinción, lo que provoca la muerte celular. Este microscopio aumenta el contraste entre los distintos orgánulos celulares por medio de cambios de fase. Permite observar células vivas.

La técnica es la siguiente: La luz atraviesa la célula, unos rayos antes que otros, por la desigual velocidad de las ondas al atravesar los orgánulos, causando en algunas de ellas un retraso o diferencias de fase. Estas diferencias de fase son convertidas en diferencias de amplitud o intensidad luminosa, lo cual provoca una diferencia en el contraste.

26.1.7. Microscopio de interferencia

El procedimiento es parecido al anterior. este microscopio es capaz de detectar cambios en el índice de refracción menores que el de contraste de fases. Así se puede observar una célula viva como si se tratase de una teñida.

Las células vivas, además de poderse observar utilizando el microscopio de contraste de fases y el de contraste interferencial, pueden observarse con el de campo oscuro. Podemos así observar los movimientos celulares, así como los procesos de división.

26.1.8. Microscopio de polarización

Tiene la misma base que el microscopio óptico, en el que se coloca un polarizador y una analizador. Su funcionamiento es análogo al microscopio petrográfico (Ver tema 3).

26.2. El microscopio electrónico (resumen)

Inventado por el alemán Ernest Ruska en la década de los años 30 como aplicación de los trabajos de Davisson y Germer en 1926. Es capaz de aumentar la imagen unas 250.000 veces. Además, posee un gran poder de resolución. Este poder alcanza hasta 10.000 veces el poder de resolución del ojo humano (el microscopio óptico tienen un poder de resolución de 500 veces). Esto se consigue utilizando una "iluminación" de longitud de onda mucho más corta ($\lambda = 0,005\text{ nm}$) que la de la luz, haces de electrones.

El premio Nobel de Física, otorgado en 1986 a los alemanes Ernts Ruska y Gerd Binning y al suizo Heinrich Roher, por sus trabajos en microscopía electrónica, reconoce la trascendencia de este descubrimiento, al que la Academia sueca declaró como uno de los más importantes del siglo.

En el microscopio electrónico la "iluminación" procede de un cátodo que emite electrones. Estos e^- pasan por una columna de 2 m. de altura, donde se ha hecho el vacío, y son acelerados en él, se amplían sucesivamente por dispositivos eléctricos y magnéticos cuyo efecto es similar al de una lente sobre la luz. Los e^- , finalmente, inciden en una pantalla fluorescente (como un monitor de televisión) y dan la imagen hiperampliada del objeto observado. El vacío impide la observación de ejemplares vivos. La muestra, además, tienen que ser cortada en secciones ultrafinas y fijada, a fin de que los e^- puedan atravesarla. Se obtiene así una buena imagen en dos dimensiones.

La muestra ha de deshidratarse (con alcohol-acetato y glutaraldeído), y fijarse (con fijadores especial, como O_4Os), tras lo que se incluye en resinas orgánicas y cortado en láminas de 20 a 60 nm. de \varnothing .

Las diferencias entre el microscopio óptico y el electrónico es la en la formación de la imagen, mientras que en el óptico depende de la desigual absorción de luz, en el electrónico depende de la difracción de los e^- . Los átomos de las muestras biológicas son de bajo peso molecular, por lo que los e^- se dispersan al chocar y no forman la imagen, por lo que es necesario tratar las muestras con átomos pesados.

Los e^- al moverse a alta velocidad se comportan como ondas luminosas, teniendo como éstas un movimiento ondulatorio. A mayor velocidad de los e^- menor es su longitud de onda, parámetro que, a su vez, es directamente proporcional al poder de resolución que se obtiene en un microscopio, de forma que a menor velocidad de los electrones mayor es el poder de resolución.

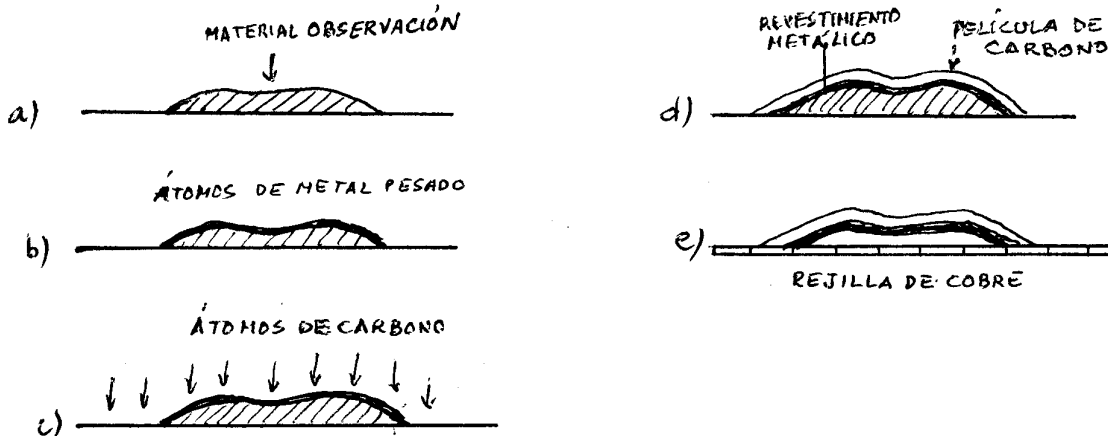
La fuente de e^- del microscopio funciona, a su vez, como acelerador. La aportación de Ruska fue la utilización de campos magnéticos como lentes ópticas, para concentrar los rayos de e^- en un punto, del mismo modo que lo hacen las lentes con los rayos luminosos. Las áreas del material observado que permiten la transmisión de e^- (transparentes a los e^-), aparecen claras y las áreas que rechazan los e^- (opacas a los e^-), son oscuras. Las fotografías de las células observadas son el material de trabajo habitual de los citólogos.

La longitud de onda (λ) de los e^- depende del voltaje (V) o potencial de aceleración y puede ser calculado por la fórmula de De Broglie:

$$\lambda = \frac{12,2}{\sqrt{V}} \text{ \AA}$$

Gerd Binnig y Henrich Rohrer fueron galardonados por el premio Nobel por sus investigaciones sobre el microscopio "Túnel de Retículo", que permite observar por primera vez partículas de dimensiones atómicas, haciendo visibles la ordenación de los átomos y sus vinculaciones en la molécula. En lo que respecta a la Biología, este microscopio ha provocado una pequeña revolución ya que permite observar las células en su estado natural.

En el **microscopio electrónico de barrido** (scanner) aparecido en la década de los cincuenta, los e^- no atraviesan la muestra sino que por el contrario, chocan contra su superficie que ha sido revestida con un material pesado como el oro (sombreado), dando así una imagen en tres dimensiones.



Se calienta junto a la muestra un filamento de metal para que se evapore, de modo que los átomos evaporados incidan sobre ella, formando una cubierta metálica más gruesa en un lado de las superficies elevadas y más fina en el otro lado. Muchas veces el material orgánico de la muestra se elimina mediante

tratamiento químico para que sólo quede una réplica metálica de la superficie, la cual se refuerza entonces con una película de carbono. Según su espesor la réplica puede examinarse con el microscopio electrónico de transmisión o con el de barrido.

El haz de e^- se enfoca en una fina sonda que recorre con exactitud el material observado. Además de los e^- que se reflejan en la superficie del material, este mismo emite e^- secundarios de baja energía como consecuencia del bombardeo electrónico proveniente de la sonda. La irregularidad de la superficie del material observado alteran la cantidad de e^- secundarios emitidos, de modo que los huecos y fisuras aparecen oscuros y las protuberancias o crestas son claras. Los e^- dispersos más los secundarios se amplifican y se transmiten a una pantalla de televisión cuyo barrido está sincronizado con la sonda.

El registro da una imagen de naturaleza tridimensional que informa sobre la superficie y la imagen total del material de estudio.

La principal restricción que presenta es que sólo podemos ver estructuras superficiales, aunque con la técnica de criofractura se pueden observar superficies de planos de fractura internos de la célula.

Criofractura.

El material se endurece por congelación rápida a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido. Los bloques son fracturados en vacío y expuestos mediante sublimación de la cubierta superficial de hielo: el plano de fractura corresponde siempre a zonas de menor resistencia (membranas). Mediante vaporización con C y metales puede obtenerse una réplica (molde) de la superficie fracturada. Se disuelven las estructuras orgánicas, por lo que, lo que se observa es la réplica.

Mediante esta técnica puede evitarse la fijación química, con lo que hay menos riesgos de desnaturalización de las estructuras. Se aplica a muchos tipos de muestras, pero sólo permite un estudio morfológico.

Mediante la **Difracción de los Rayos X** podemos estudiar estructuras que tengan ordenación periódica en el espacio. La ventaja es poder observar muestras gruesas y sin tratamientos. Se basa en el hecho de que los rayos X, al incidir en la muestra son difractados igual que los rayos luminosos. Los rayos difractados se recogen en una placa fotográfica que origina un modelo de difracción, que puede ser interpretado determinando la estructura del objeto. Es la técnica que se utilizó para averiguar la estructura del ADN. También para conocer la estructura interna de los cristales (Laüagrama).

26.3. Otros métodos de investigación citológica

➤ Estudios bioquímicos de las células.

Se trata de conocer los componentes químicos de la célula y su localización en los orgánulos que forman su estructura.

El primer paso en esta investigación, es la obtención de fragmentos celulares donde se localicen los orgánulos que se desean estudiar. Para eso, se **trituran** las células sumergidas en una solución de sacarosa con aparatos del tipo de las batidoras domésticas o bien por medio de tensoactivos. Se obtienen así una suspensión de fragmentos celulares, de la que habrá que los orgánulos deseados.

La separación se realiza en una **ultracentrifugadora**, introduciendo la suspensión celular en una solución más densa aún de sacarosa. Los orgánulos más densos (núcleos) se van al fondo del tubo de centrifuga, mientras que los menos densos (mitocondrias, membrana de retículo, ribosomas,...) quedan en la superficie. Cada fracción puede someterse a nuevas centrifugaciones con soluciones de distintas concentraciones de sacarosa, para ir obteniendo los componentes celulares cada vez más purificados. Separados los componentes celulares, se procede al análisis químico.

- Otro procedimiento de **Ultracentrifugación**, es el siguiente:

La densidad de una molécula se determina mediante el uso de una técnica conocida como **centrifugación en gradiente de densidad**. En esta técnica, una solución de CICs se somete a rotación en una ultracentrifugadora a gran velocidad durante varias horas. La consecuencia es que se alcanza un equilibrio entre la difusión de la molécula en la solución y la fuerza centrífuga (inercia de la molécula que tiende a irse al fondo del tubo al ser sometida a rotación), de forma que se establece un gradiente de densidad en el tubo con una concentración creciente de CICs desde la boca hasta el fondo del tubo. La molécula (por ejemplo el ADN) se situará en el punto del tubo donde su densidad sea la misma que la del CICs. Las

bandas se pueden detectar observando los tubos con luz UV de 260 nm, que es absorbida por los ácidos nucleicos.

Este método permite el fraccionamiento de las células, aislando sus orgánulos y sus macromoléculas funcionales. Se procede de la forma siguiente:

- 1º Se centrifuga a baja velocidad (1000 g durante 10 minutos) un homogeneizado del tejido. El precipitado contiene células enteras, núcleos y citoesqueleto.
- 2º El sobrenadante se somete a centrifugación a velocidad media (20.000 g durante 20 minutos). El precipitado contiene mitocondrias, peroxisomas y lisosomas.
- 3º El sobrenadante es sometido a centrifugación de alta velocidad (80.000 g durante una hora). El precipitado contiene microsomas y pequeñas vesículas.
- 4º El sobrenadante es sometido a centrifugación de muy alta velocidad (150.000 g durante 3 horas). El precipitado contiene ribosomas, virus y macromoléculas muy grandes.

Los extractos celulares fraccionados mantienen su actividad biológica, por lo que se utilizan para determinar procesos celulares complejos.

Estas investigaciones son complementadas con otras que permiten visualizar en el microscopio la localización de los diferentes compuestos químicos en la estructura celular. Básicamente se puede hablar de dos métodos de localización de sustancias químicas:

- Tinción de la preparación celular con productos que reaccionen específicamente con una determinada sustancia, produciéndose una coloración, fluorescencia u opacidad reconocible al microscopio óptico o electrónico.

Adición de sustancias radiactivas a las células, que se fijarán en estructuras específicas. Una vez realizada la preparación microscópica de las células previamente tratadas, se recubre ésta con una emulsión fotográfica, que quedará impresionada en los puntos en que se produzca radiación.

➤ **Métodos de seguimiento radiactivo.**

Cuando se da a una célula un metabolito marcado con un átomo radiactivo (*), la célula lo utiliza igual que al isótopo no radiactivo. El átomo marcado se incorpora a los componentes celulares y es utilizado como marcador. Generalmente se utilizan precursores marcados de tritio (H^3).

La detección de la radiactividad incorporada se lleva a cabo mediante aplicación de una emulsión fotográfica sobre el corte: las radiaciones emitidas por los átomos radiactivos impresionan la emulsión que, después, se revela como una película fotográfica ordinaria. Los granos de plata metálica se localizan sobre estructuras que han incorporado los átomos radiactivos.

Otros elementos radiactivos son el C^{14} , P radiactivo, etc.

➤ **Métodos de estudio fisiológicos**

Para estudiar la función de cada orgánulo, no es suficiente con saber su forma y composición, hay que acudir al estudio de su "comportamiento", bien "in vivo", o bien "in vitro", sometiéndolos a la influencia de métodos nutritivos carenciales y observando al microscopio los posibles efectos, así como analizando los productos resultantes.

➤ **Técnicas para el estudio del contenido químico de la célula**

Estas técnicas permiten explorar las condiciones químicas del interior de las células vivas. Entre ellas se encuentran la resonancia magnética nuclear y los microelectrodos de vidrio.

La **resonancia magnética nuclear** mide las concentraciones relativas de muchas moléculas pequeñas en solución. No se precisan muestras cristalizadas, pero tiene la desventaja de que requiere grandes cantidades de muestra.

Si se introducen **microelectrodos de vidrio** en las células vivas, se pueden estudiar los potenciales eléctricos a través de la membrana plasmática, así como las concentraciones intracelulares de iones orgánicos,

➤ **Inmunocitoquímica**

Se utiliza para localizar en la célula sustancias con propiedades antigénicas. Se utiliza su capacidad para formar complejos con los anticuerpos.

Se inyecta una sustancia X a un animal (conejo, rata), los anticuerpos que éste forma (antiX) se extraen y purifican. Se asocian los anticuerpos a moléculas opacas a los electrones (ferritina) o a un enzima fácilmente detectable. En presencia de la sustancia X, el anticuerpo “marcado” forma con ella un complejo visible y detectable al ME.

26.4. Niveles de organización celular: procariotas y eucariotas.

Dentro de la jerarquía de los niveles de organización de la materia, y por encima del nivel molecular, está el **nivel celular**, donde las estructuras alcanzan el grado de complejidad necesario para manifestar propiedades vitales. Un organismo no es simplemente un mosaico de estructuras independientes, sino un sistema integrado y autorregulado, en el que la estructura y la función son inseparables.

Según el grado de complejidad se pueden considerar dos tipos de organización celular: la **célula procariota** y la **eucariota** (E. Chatton). Además de estos dos niveles de organización celular se considera un tercer tipo de organización, formado por los virus, cuya extraordinaria simplicidad estructural y la carencia de metabolismo propio los convierte en organismos que se sitúan entre lo vivo y lo inerte.

Los **procariotas** son el conjunto de organismos unicelulares que constituyen el grupo de las **Moneras**, en el que se incluyen las bacterias, las algas cianofíceas y los micoplasmas. Carecen de verdadero núcleo aislado por una membrana nuclear; su material cromosómico está formado por ADN desnudo. El protoplasma está poco diferenciado y con escaso grado de compartimentización.

La **célula eucariota** es objeto de desarrollo en otro tema específico (contienen verdadero núcleo y alta compartimentación celular). Todos los demás seres vivos tienen células de este tipo.

26.5. Morfología de la célula eucariota

26.5.1. Evolución celular: Teoría de la endosimbiosis

Los primeros fósiles confirmados de **EUCARIONTES** tienen una antigüedad de unos 1.000 millones de años. Se han elaborado varias hipótesis para explicar su aparición:

- **Hipótesis autógena** (Taylor y Dobson), el origen de las células eucariotas serían células procariotas que aumentarían de tamaño y su citoplasma se compartimentaría por medio de membranas. Estos compartimentos darían lugar a los orgánulos celulares eucariotas. Teniendo en cuenta que los orgánulos celulares han aparecido a través de millones de años de evolución, no se explica la ausencia de células de organización intermedia y, por tanto, esta teoría tiene pocos seguidores.
- **Hipótesis de la endosimbiosis** (Lynn, Margulis, Sagan), el origen de las células eucariotas sería por continuos procesos de simbiosis entre diversas células procariotas, que se transformaron en los diversos orgánulos celulares. Las células procariotas serían fagocitadas por un procariota ancestral anaerobio, estableciéndose una relación simbiótica entre dichas células. Así, se piensa que las mitocondrias surgirían de bacterias aerobias, los cloroplastos de cianobacterias, los cilios y flagelos de bacterias espiroquetas, etc.

26.5.2. Forma y tamaño de las células animales y vegetales

Una de las características de las células es su diversidad. Existe, entre los seres vivos de organización eucariótica, una gran variedad, en cuanto al tamaño, forma y estructura interna de sus células. La mayoría son células microscópicas: aproximadamente 40 μ las células vegetales y 15 μ las animales, exceptuando células gigantes de huevo de ave (óvulos), las células que forman los músculos estriados y las fibras vegetales. En los pluricelulares no hay relación alguna entre el tamaño de la célula y el del individuo.

La forma y el tamaño de una célula guarda relación con su función específica. Aunque las células tienden a ser esféricas, existen muchos tipos celulares, con formas características: poliédricas, estrelladas, semilunares, etc. Algunas células, como las amebas y los glóbulos rojos, cambian su forma al desplazarse de un lugar a otro.

Dentro de nuestro cuerpo hay más de 100 tipos distintos de células. En el agua de un estanque se pueden encontrar bastantes organismos unicelulares distintos. Los insectos tienen muchas clases de células de las que carecen los vertebrados y los vegetales.

Respecto a la cantidad de células que hay en un ser vivo pluricelular, es variable en general, si bien hay algunas excepciones (el rotífero *Epiphanos senta* tiene 959); en el resto de especies suele haber relación entre la cantidad de células y el tamaño del individuo. Como curiosidad cabe destacar que en el hombre, el nº de células varía entre 10^{13} y 10^{14} , sin tener en cuenta las células sanguíneas.

26.5.3. Semejanzas y diferencias

Dentro de su diversidad, los diferentes tipos de células tienen muchas características en común, según su estructura y función. Existen, no obstante, algunas diferencias importantes que conviene destacar entre las células animales y vegetales.

Las células vegetales, a diferencia de las animales:

- Presentan paredes rígidas de celulosa (**pared celular**) en torno a la membrana plasmática, lo que les impide cambiar de forma. La pared celular marca la existencia de los vegetales no sólo en su aspecto estructural, sino definiendo la práctica totalidad de sus procesos biológicos. Se trata de una forma especializada de matriz extracelular, adosada a la membrana plasmática de las células vegetales, siendo más organizada y rígida que el glucocálix de las células animales.
- Al desarrollar unas paredes relativamente rígidas a lo largo de la evolución, las plantas perdieron la capacidad de desplazarse, y por ello no desarrollaron ni músculos, ni hueso, ni sistema nervioso. Las mayores diferencias entre plantas y animales en cuanto a nutrición, osmorregulación, crecimiento, reproducción, mecanismos de defensa y morfológicos, se pueden atribuir a la pared celular vegetal. Asimismo, los procesos diferenciales en los vegetales, como maduración del fruto, floración y germinación, están determinados por la presencia de esta estructura.
- La pared celular proporciona un hábitáculo a la célula vegetal; cada pared interacciona con la de sus vecinas, uniéndolas y formando la planta íntegra. Origina también conductos para transportar la savia dentro de la planta; por consiguiente, estas paredes son responsables de funciones que en los animales realizan los huesos, la piel, el sistema circulatorio, etc. Los distintos tipos de células vegetales se reconocen y clasifican atendiendo a la forma y naturaleza de sus paredes celulares.
- Contienen **cloroplastos** para realizar la fotosíntesis. Son orgánulos receptores de la energía luminosa, que convierten en energía química (ATP), para la biosíntesis de materia orgánica, a partir del CO_2 , agua y sales minerales.
Tienen doble envoltura e información genética propia. Se originan a partir de protoplastidios, pequeños orgánulos que aparecen en las células meristemáticas y que evolucionan a medida que se diferencia la célula adulta, originando los distintos tipos de plastos: Leucoplastos, Cromoplastos y cloroplastos.
- **Poseen gran número de vacuolas**, ocupando en las células viejas la mayor parte del citoplasma. Se definen como enclaves líquidos limitados por una membrana o tonoplasto. Su utilidad es diversa: acumular exceso de agua, almacenar sustancias nutritivas o productos de desecho, contener pigmentos que dan color a las flores (antociánicos, flavonas, etc).
- Las células de las plantas superiores **carecen de centriolo**. Tras sus procesos de mitosis, las células se separan mediante la formación del fragmoplasto (lámina media de la futura pared celular).
- Los **lisosomas son muy escasos**, aparecen en las semillas en germinación y en las plantas insectívoras. En los vegetales se presentan en forma de granos de aleurona, y sirven para digerir los nutrientes en las primeras fases de la germinación de la semilla.

26.6. Fisiología celular

Al definir la teoría celular, se destaca que la célula, además de unidad estructural, es también la unidad fisiológica de los seres vivos. Consecuentemente, realiza las funciones básicas que definen la vida: obtiene energía del medio ambiente y la transforma en energía útil para la célula (nutrición); aplica esta energía para recibir estímulos del medio externo y elaborar respuestas propias (relación); y se autopropaga a lo largo del tiempo (reproducción)

26.6.1. Funciones de nutrición

Es la función mediante la cual la célula intercambia materia y energía con el medio ambiente. Se desarrolla en las siguientes fases:

- a) **Incorporación** de nutrientes a través de la membrana plasmática. En ciertos seres unicelulares aparecen estructuras permanentes para este fin, por ejemplo, el citostoma y la citofaringe de los ciliados.
- b) **Procesamiento** o transformación de nutrientes en sustancias utilizables por la célula. Las células autótrofas incorporan materia inorgánica, que transforman en orgánica mediante la energía solar (autótrofas fotosintéticas), o bien por la energía procedente de reacciones exotérmicas del suelo (autótrofas quimiosintéticas).
Las células heterótrofas incorporan materia orgánica procedente de células autótrofas o de otras heterótrofas.
- c) **Excreción** de los productos de desecho resultantes del metabolismo, o formación de inclusiones no tóxicas, que en otro caso resultarían perjudiciales para la economía celular.

26.6.2. Funciones de relación

Es la función mediante la cual la célula entra en contacto con el medio ambiente, para recoger información del medio externo (**estímulo**), de la manera más ventajosa para su supervivencia, y elaborar respuestas adecuadas (**excitabilidad**).

Los estímulos pueden ser químicos, térmicos, luminosos, etc. La respuesta depende del tipo de células y de la naturaleza del estímulo. En células de vida libre, la respuesta va acompañada de desplazamiento mediante pseudópodos, cilios o flagelos. En otras ocasiones, la respuesta no va acompañada de desplazamiento, y se manifiesta por movimientos endocelulares de los orgánulos o segregando membranas externas limitantes de gran resistencia ante las condiciones adversas del medio.

26.6.3. Funciones de reproducción

Es la función que asegura la perpetuidad de la especie. Las células se dividen, dando origen a otras de características similares a ellas; ello supone la división del material hereditario contenido en el núcleo y la división del citoplasma.

El material nuclear se duplica, repartiéndose posteriormente de manera equitativa entre las dos células hijas (mitosis).

La división del citoplasma para formar células hijas presenta muchas modalidades: bipartición, pluripartición, gemación, etc.

26.7. Formas acelulares.

Virus. Son seres de extraordinaria simplicidad, formados por una cápsida y un ácido nucleico, nunca los dos. Su nivel de organización se encuentra entre lo vivo y lo inerte, ya que, por un lado, son capaces de autoduplicarse dentro de células vivas, mientras que, por otro, cristalizan al separarlos de las células en las que parasitan. Se les define como parásitos intracelulares obligados. Su estudio se aborda en otro tema.

Viroides. Son pequeñas moléculas de ARN, sin cápsida proteica, con capacidad infecciosa en células susceptibles. Por ellos es provocada la enfermedad del husillo de la patata o el tomate (viroide PSTV con ARN bicatenario) o la exocortis de los cítricos. Se suelen alojar en el núcleo de las células; no se conoce bien ni su mecanismo de replicación ni su mecanismo infeccioso.

Parece ser que los viroides no sólo dependen de la célula huésped para las materias primas necesarias para su replicación, sino también para los enzimas responsables de la misma. No se han encontrado evidencias de viroides parásitos de células animales, aunque se sospecha de su existencia.

Virusoides. Se consideran virus de los propios virus.

Priones. Es una simple molécula proteica con capacidad infecciosa. El premio Nobel de Medicina de 1997 se otorgó al bioquímico norteamericano Stanley B. Prusiner por el descubrimiento y estudio de los priones. Aunque carecen de ácidos nucleicos, son capaces de producir nuevos priones en los tejidos infectados. El mecanismo para su replicación se desconoce. Una hipótesis apunta hacia la posibilidad de que el prion active en las células eucarióticas parasitadas un gen “latente” con la información que permita formar nuevos priones.

Son glucoproteínas (PrP), que en el hombre están formadas por 253 aminoácidos codificados por un gen del cromosoma 20 y cuya función es desconocida, aunque sí se conoce su presencia en la superficie de diversos tipos celulares (neuronas, células de la glía, linfocitos y otras). Aparentemente, la forma normal de la proteína, PrP^c se transforma por mutación en la forma infecciosa PrP^{sc}, cuya presencia parece imprescindible para que se dé la enfermedad.

Se desconoce si actúan solos o acompañadas por otra gama de proteínas conocidas como “chaperons”, o conjuntamente con algún virus, ¿cómo se contagian?, ¿tratamiento?

Se conocen cuatro enfermedades nerviosas en los seres humanos (kuru, enfermedad de Gerstmann-Jakob o CJ también llamada de las vacas locas y la enfermedad de Gerstmann-Sträuser-Scheiner o GSS y el Insomnio Familiar Letal) y cuatro en los animales¹ causadas por priones. Todas estas enfermedades tienen un lento desarrollo, son mortales y se cree que están causadas por la ingestión de una proteína de un individuo infectado; no hay curación y se desconoce su mecanismo de acción.

¹ en ovejas y cabras el plurigo lumbar, encefalopatía espongiforme bovina (vacas locas), encefalopatía contagiosa del visón y diarrea crónica en el ciervo y en el arce.