

**REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE  
GRANADA**

**DISCURSO**

**Pronunciado por el**

**Ilmo. Sr. D. Pascual Vicente Crespo Ferrer**

**Biología y Terapia Celular. Mitos y Realidades**

**CONTESTACIÓN**

**Del**

**Excmo. Sr. D. Antonio Campos Muñoz**

**12 de Marzo**

**Granada 2010**

# Prólogo

Excma. Sra. Presidenta de la Real Academia de Medicina y Cirugía del Distrito de Granada (Andalucía Oriental)

Excmo. Sr. Presidente del Instituto de Reales Academias de Andalucía

Excmos. e Ilmos. Sres. Académico

Querida familia

Queridos amigos

Señores y señoras

El discurso que ahora comienzo tiene por objeto mi ingreso oficial en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Granada, y quiero empezar en homenaje al Profesor Gómez Sánchez, el iniciador de nuestra Escuela, como él lo hizo en su discurso de ingreso el 16 de Octubre de 1980 en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz. En esa fecha yo estaba recién licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Cádiz y como espectador empezaba a soñar y a trenzar las guías que me atarían para siempre hacia el apasionante mundo histológico. Dicho ingreso me hizo conocer por primera vez el mundo de las Academias y desde entonces experimenté respeto y admiración hacia ellas. El discurso comenzó así, y quiero intencionadamente para esta ocasión hacer mías sus palabras “ *Sería faltar a la tradición y a la cortesía pero, muy en primer término, a los sentimientos que en esta solemne ocasión nos embargan, si mis primeras palabras no fuesen de gratitud hacia la docta Corporación que, al acogerme en su seno, me ha distinguido, no ya con una estimación benévola de mis contados merecimientos, sino -y para mi tiene esta actitud especial valor- juzgándome digno de una convivencia a cuyas reglas espero no faltar. Por tanto, me presento ante ustedes revestidos de mis más profundos y sinceros sentimientos de gratitud, responsabilidad y compromiso*”.

Gratitud que deseo expresar en primer lugar a su Presidenta, la profesora D<sup>a</sup> Carmen Maroto, y a todos los miembros de esta docta Corporación por la decisión que han tomado al dedicar un sillón, el número 19 con la denominación de Biología y Terapia Celular, pero sobre todo por haber aceptado la propuesta, que en su día realizaron los Profesores D. Enrique Villanueva, D. Ramón Gálvez y D. Vicente Pedraza que tuvieron la generosidad de proponerme para el alto honor que representa pertenecer y formar parte de esta Corporación. A ellos, mi más profunda admiración y respeto.

El sillón nº 19, se creó según los estatutos de esta Corporación en 1886 dedicado a Farmacia y desde ese mismo año lo han ocupado D. Justo Ortiz Pujazón, D. Manuel Rodríguez Ávila, D. Juan Casas Fernández, D. Carlos Rodríguez López Neyra, D. Diego Guevara Pozo y D. Jesús Thomas Gómez. Sucedo a ilustres personas, donde el medicamento era su norte y su guía, no es de extrañar que cuando esta Corporación decidió la creación del sillón de Biología y Terapia Celular, pensase en dicho número, pues la célula en la actualidad hemos de entenderla, como tendremos ocasión de analizar en este discurso, como un medicamento.

Sustituir a la figura de D. Jesús Thomas Gómez, no es tarea fácil dada su trayectoria universitaria y académica. Ha sido catedrático de Química Física y profesor emérito de esta Universidad. Ha ocupado todos los cargos posibles en la Facultad de Farmacia: Director de Departamento, Secretario, Vicedecano y Decano. Su última gestión ha sido ser Defensor Universitario. Ha pertenecido a distintas academias. Como homenaje a su figura la Facultad de Farmacia decidió nombrar el Museo de Instrumentación Científica con su nombre. Como podrán comprobar superar a dicha figura es realmente difícil. No tengo las cualidades del profesor Thomas, pero les aseguro que voluntad y constancia para seguir su estela si las poseo, e intentaré continuar su trayectoria. Aquí está mi compromiso y mi responsabilidad.

Fernando Colomo dirigió en 1978, una película llamada *¿Qué hace una chica como tú en un sitio como este?*, a la vez, el grupo Burning cantaba con éxito la canción del mismo título, en ese año yo estaba en cuarto de Medicina, y era habitual utilizar dicha frase con la música de Burning cuando te encontrabas a alguien por los pasillos de la Facultad o por el Colegio Mayor Beato Diego donde yo residía. Y ahora me pregunto recordando aquellos años, algo más de 30 *¿Qué hace un chico como tú en sitio como este?*

La respuesta a esta pregunta, tiene distintos orígenes que intentaré explicar. El primero como nos recordó Ayala cuando fue investido doctor "Honoris causa" en nuestra universidad, utilizando lo que el personaje cervantino don Álvaro Tarfe le declaró a don Quijote: *"Siempre he insistido en afirmar mi creencia de que el "paisaje materno", esto es, la revelación del mundo al que abre uno los ojos al nacer para ir descubriéndolo y reconociéndose en él poco a poco durante la niñez y adolescencia, marca de manera indeleble, definitiva y permanente los rasgos de cada personalidad"*. Al igual que Don Álvaro puedo afirmar que mi paisaje materno, me marcó y me sigue marcando mucho. Al nacer en una familia de tradición marinera en el Puerto de Santa María (Cádiz). Mis padres, a mi hermana Dioni y a mi, nos dieron todo lo que unos niños pueden necesitar y soñar, con todo tipo de esfuerzos y de renunciaciones. Por tanto a ellos les debo en primer lugar estar aquí.

En segundo lugar, nacer en la calle Misericordia número cinco, cerca del Hospital que la Orden Hospitalaria de San Juan de Dios fundará en el Puerto en 1661, y que hoy pertenece a la Orden Religiosa de las Esclavas. Allí tuve la primera presencia real de Dios, curiosamente ante San Juan de Dios y la Virgen de las Angustias. Desde esos primeros años Granada y la Orden Hospitalaria ya estaban presentes en mi vida, aún sin yo saberlo. Esto significa mucho para mí, ya que a ÉL (con mayúscula) se lo debo todo.

En tercer lugar, a mi vocación médica que me llevó a estudiar la Licenciatura de Medicina en la Facultad de Cádiz. En esta Facultad el peso de la historia es evidente, no debemos olvidar que allí se va a producir la renovación en el siglo XVIII de los conocimientos médico-quirúrgicos de nuestro país con la creación del *"Real Colegio de Cirugía de la Armada de Cádiz"* en 1748, y que pronto se convertirá en la Institución Médica de mayor prestigio en España, dando la mejor formación quirúrgica y médica de la época.

Y en 1791 se transforma en el “*Real Colegio de Medicina y Cirugía*”, uniendo ambas profesiones en la misma titulación.

Debido a su solera, como los buenos vinos de mi tierra, por la Facultad de Medicina de Cádiz, han pasado por sus aulas, ya en calidad de alumno ó en calidad de profesor, entre otros: Pedro Virgili, José Celestino Mutis, Antonio de Gimbernat, Francisco Javier Laso de la Vega, Cayetano del Toro, Federico Rubio, Rafael Ariza, Alejandro San Martín, Pedro Ramón y Cajal, Luís Urtubey, José Cabré Piera, Francisco Orts Llorca, Manuel Cruz Hernández, Ignacio Pérez de Vargas o los actuales académicos de esta docta Corporación como Ignacio Arcelus, José Rico, Antonio Campos, Juan Antonio Molina, Armando Zuloaga.

Allí tuve la suerte de realizar mis estudios de Medicina y de tener un cuadro de profesores excelentes, resaltar de entre todos ellos, a los profesores José Gómez, José Vilches, Antonio López, Eduardo Cuenca, José Mira, Antonio Orozco, Eduardo Zamora, Juan Bartual, Josep Argemí, Juan Ocaña, Cesáreo Remón. Sin embargo, sobre todos ellos me impactó, el profesor Campos, recuerdo todavía la primera clase, “el microscopio”. Era puro entusiasmo, puro torbellino, pura ilusión por el mundo de la células y los tejidos, bueno que os voy a decir yo del profesor Campos que todos vosotros no sepáis. Él me enseñó, en aquellos años que existía un mundo microscópico en el que las fronteras no tenían cabida. Recuerdo que al final de la primera clase utilizó para despedirse las palabras de Cajal, “*No hay cuestiones agotadas, sino hombres agotados en cuestiones*”. Ellas han estado y están presentes a largo de mi vida. Decía Laín Entralgo que alguien no entiende una ciencia de veras hasta que no la ve encarnada en una persona. Desde ese día, la ciencia histológica me sedujo de tal manera que decidí abandonar la labor asistencial por la vida universitaria. Les aseguro que no fue fácil tomar esa decisión, y aún hoy no me arrepiento.

Una vez tomada la decisión de ser histólogo y contarle mis inquietudes al profesor Campos, que por aquella época era jefe de estudios del Colegio Mayor Beato Diego, hablamos más detenidamente del tema, recuerdo que dimos un paseo por el Puerto de Cádiz, esa inmensa bahía era semejante a mi inmensa curiosidad y a las ganas de descubrir el mundo histológico, como si bucear en las células y en los tejidos fuera sumergirse en ese profundo mar azul. Desde ese momento el profesor Campos, me tuteló, me orientó, con su buen hacer, hacia el aprendizaje y dominio de la ciencia histológica. Primero en la Universidad de Oviedo a finales de 1980, y después en la Universidad de Granada a partir del curso 81-82, a excepción del periodo de dos años que regresé a la vetusta Oviedo como catedrático de la Facultad de Medicina. La policromía paisajística, la arquitectura, los olores, la idiosincracia, el “orbayu”, y por supuesto sus gentes, mis compañeros, mis amigos, hicieron que la añoranza y el recuerdo constante de mi familia en Granada, a pesar de la distancia física fuese algo mas llevadero. Retornando, finalmente, a esta casa como catedrático de Biología Celular en el año 1998. En palabras del granadino Ángel Ganivet hay personas que modelan y forman, pues bien, el profesor Campos es una de esas personas. Me “*formó*”, tanto en el espíritu profesional de la histología moderna como en los aspectos culturales e

intelectuales necesarios para ser un universitario en el sentido orteguiano. Quizás la obra no haya quedado como se esperaba, debido a las limitaciones y defectos que tengo como persona. Lo realmente importante es que desde aquellos años, lo considero mi maestro, mi compañero y mi amigo. A él le debo básicamente estar hoy aquí.

Pedro de Soto de Rojas escribió que Granada era “*paraíso cerrado para muchos y jardines abiertos para pocos*”, para mi desde el principio fue y es, un jardín. Cuatro razones lo justifican. La primera, aquí inicie con M<sup>a</sup> Eugenia, mi mujer, la creación de nuestra familia, fruto de ella son nuestros dos hijos Vicente y Benjamín, sin ellos no podría, ni ser, ni estar, porque constituyen el eje de mi vida, el fruto de mis afanes y desvelos. La segunda, aquí me formé como histólogo, en el Departamento de Biología Celular, ahora denominado Histología de la Universidad de Granada, sin la comprensión, la amistad y la generosidad de todos los que lo integraron e integran en la actualidad, no podría ser lo que soy. La tercera, el claustro de profesores de la Facultad de Medicina, que me apoyaron y me demostraron su confianza desde el principio y aún con el paso de los años, sigue siendo así, a todos mi admiración. De este claustro de profesores, quiero rescatar de mi memoria esta noche; al profesor Juan Ocaña, ya que nos encontramos de nuevo en Granada y que fue secretario de esta Corporación y su mujer, la profesora Wilhelmi, desde Cádiz establecimos una relación de amistad y respeto mutuo al ser él el director del Colegio Mayor Beato Diego –lugar donde viví durante los seis años que estudié en Cádiz-; al profesor Luis Álvarez que desde el principio confió en mi persona y me propuso junto con su mujer la profesora Aránega para el premio Alejandro Otero; al profesor José Manuel Chamorro con el que compartí los inicios y las ilusiones de la creación de la Facultad de Odontología y por último al profesor emérito Juan de Dios García, que me formó en los temas de embriología, como solo él sabe hacerlo, y que completaron mi formación histológica. Hablar con él de Cádiz siempre es un placer. Y la cuarta razón, y no por ser la última es menos importante, la familia Agustiniiana del Colegio Santo Tomás de Villanueva, ellos nos acogieron como suyos, y nosotros los sentimos como nuestros, nos impregnaron del espíritu de San Agustín que nos motiva en nuestro día a día.

Javier Ruibal, amigo, paisano, compositor y cantautor de algunas de las canciones de amor más bellas jamás oídas, nos relata en una de ellas, como la protagonista anhelaba la rosa más preciada, la de las ilusiones, la de las esperanzas, la de la sabiduría, la del amor, la rosa azul de Alejandría y la buscaba en Granada. Esta rosa yo siempre la situé y la encontré en este espacio de Granada, en la Facultad de Medicina y en su Real Academia, con este acto me dais la oportunidad de incluirla, ahora, también en mi jardín abierto granadino.

Como exige el protocolo seré contestado como beneficiario, por el Profesor Campos, quiero expresar de nuevo mi gratitud por ser él quien lo realice. No hay mayor honor y gratitud para un discípulo que sea su maestro quien lo reciba.

Sobre la elección del título, pensé que al ser un sillón de nueva creación, analizar su nueva denominación podría ser conveniente. La célula y su implicación en la medicina ha sido estudiada por histólogos y biólogos a lo largo de los tiempos. San Agustín dice: *“La aritmética del cielo es distinta de la nuestra; y el cielo no fabrica la historia, como los hombres, con lo que nos parece bien, sino con todo lo que ha sucedido, sea bueno o malo”*. A este propósito Laín Entralgo afirma: el conocimiento riguroso del pasado debe enseñarnos no solo *“lo que en el pasado fue”* sino también *“lo que pudo haber sido y no fue”*. Probablemente estas reflexiones me hayan influenciado para que al título de Biología y Terapia Celular le añada también el de Mitos y Realidades.

## Planteamiento

***Si queremos llegar a comprender lo invisible, debemos penetrar,  
tan profundamente como podamos, en lo visible***  
**Max Beckmann**

El libro *“Citología General”* de GRUNDMANN (1967), comienza diciendo *“Vida y muerte: los más profundos arcanos yacen en el límite que las separa”*. Creo que no he encontrado mejor inicio para este discurso de ingreso en el que trataremos a la célula viva y a la célula muerta, al ser hoy la célula una realidad de nuestro arsenal terapéutico.

ORTEGA y GASSET, en unas conferencias que dictó en Buenos Aires en 1928, nos define la vida como *“lo que somos y lo que hacemos”*. Sin embargo, para los que nos dedicamos y estudiamos el mundo biológico, la vida la delimitamos más específicamente al nivel orgánico. De DUVE (2004) nos recuerda desde un punto de vista vitalista, que la vida es *“materia animada”*, del latín *anima*, alma. Simplemente se atribuía al alma, o espíritu vital, todo lo que no se comprendía acerca de la vida.

En la actualidad, el vitalismo tiene poco adeptos, y los ha ido perdiendo a medida que los seres vivos se han ido explicando cada vez más en los términos de la física y la química. SCHRÖDINGER, famoso científico refugiado de la Austria ocupada por Hitler, un cinco de febrero de 1943 en la sala de conferencia del Trinity College de Dublín abarrotada de todo tipo de personalidades impartía una serie de tres conferencias. La primera de ellas se titulaba *“¿Qué es la vida? El aspecto físico de la célula viva”*. En ella, destacó dos propiedades de los seres vivos: capacidad de crear orden a partir del desorden, gracias a la *“entropía negativa”*; y capacidad de transmitir su programa específico de generación en generación, propiedad que SCHRÖDINGER, que no sabía nada del ADN, atribuía a un *“cristal aperiódico”*. Para él, el secreto de la vida lo localizaba en un grupo de *“átomos estrictamente ordenados”* que formaban el código de transmisión genética. La repercusión de dicha conferencia fue tal, que hasta la revista *Time* en su número del cinco de abril hizo especial referencia a ella.

La demostración de que el material genético es el ADN por AVERY, MCLEOD y MACCARTY se realizó en 1944, y llevaron a WATSON y CRICK a

construir, en 1953, la famosa maqueta de la molécula del ADN. Pero tuvieron que pasar cincuenta años, para que se lograra descifrar el genoma humano, constituido por las tres mil doscientos millones de letras del ADN humano, con sus aproximadamente treinta mil genes en cuarenta y seis cromosomas. El conocimiento del genoma humano desvela el catálogo de instrucciones sobre el diseño y funcionamiento de la célula. Con este último descubrimiento la pregunta de ¿qué es la vida? puede darse por respondida desde el punto de vista biológico.

Sin embargo, Von NEUMANN (1951) postula una corriente en la cual utiliza los ordenadores como metáfora, y describe un analogía entre funcionamiento de los seres vivos y el de autómatas mecánicos, observando que el metabolismo y la replicación, pueden separarse de manera lógica. Para él la vida es cosa de metabolismo y replicación. Por otra parte, DYSON (1999) piensa que la vida, fundamentalmente, es metabolismo. Esto hizo que la NASA cuando envió las naves Viking a Marte con el objetivo de encontrar signos de vida extraterrestre en la superficie del planeta, lo que buscaba eran signos de metabolismo. A lo largo del discurso aparecerá este pensamiento y veremos que nos puede deparar.

Una vez revelado, por los avances de la biología celular y molecular que la vida es lo que es común a todos los seres vivos. Surge la pregunta ¿Qué es común a todos los seres vivos? Hoy en día, a este ser común, lo denominamos "*Last Universal Common Ancestro*" (LUCA), probablemente una protocélula unicelular y procariótica. Tendríamos que remontarnos a más de tres mil millones de años para encontrarlo. SHAPIRO, dice "*Que las estanterías crujen bajo el peso de los libros que tratan sobre el origen de la vida*". El crujido de las estanterías es una clara señal de que aún, no lo conocemos todo con total seguridad.

OPARIN en 1924 en su libro "*The Origin of Life on Earth*" propuso la idea de la existencia de un "*caldo primordial*" como origen de la vida. De igual forma ZUBIRI (2003) sugirió que la vida comenzó siendo en un principio "*materia viva*", la cual no estaba celularmente organizada.

Así en la actualidad, esta biogénesis desde el punto de vista científico, se puede resumir como sigue: tras la gran explosión del universo, la atmósfera de la Tierra carecía de oxígeno. Los gases originarios, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub> reaccionaron entre sí formando biomonómeros: aminoácidos, bases, ácidos, lípidos. Así al principio intervino la química, produciendo moléculas sencillas que interaccionaron formando moléculas de mayor complejidad, los biopolímeros autorreplicativos (ARN y ADN). Esto lo sabemos por MILLER (1953) que estableció las condiciones prebióticas más adecuadas para la vida, aunque fue hasta 1992 cuando WÄCHTERSCHÄUSTER solventó este dilema.

De este modo se formaron las primeras estructuras similares a las células vivientes, que surgieron de la envoltura del ARN de replicación propia por una membrana compuesta por fosfolípidos, y a su vez comenzaron a multiplicarse. La evolución se inició a través de la variación y la selección natural postulada por DARWIN (1859), en la cual, la contingencia permite que

los organismos se adapten a entornos locales cambiantes. Sin embargo, a esta contingencia, actualmente se le añade el azar propuesto por MONOD (1973) guiado por la reflexión de DEMÓCRITO de que “*Todo lo que existe en el universo es fruto del azar y de la necesidad*”. Con este darwinismo explicamos la aparición de nuevos modos de adaptación y nuevos nichos ecológicos.

Pero en un momento determinado, las células llegaron a ser tan complicadas que el intercambio ya no resultaba tan sencillo. Este momento, denominado el “*umbral darwiniano*” nos permitió explicar la transmisión de la información a los descendientes. Por ello, las bacterias primigenias copian sus genes por completo, y transmiten estas copias a sus células hijas. Así la Tierra se convirtió en el hogar de bacterias y viscosos lechos biológicos verdes, los padres de todas las plantas, animales y del ser humano.

De este proceso de biogénesis se deducen dos hechos relevantes, que la vida comenzó en todos los seres vivos con la organización de las grandes moléculas en una estructura celular. Y que la biotecnología existe, como afirman SCHNEIDER y SAGAN (2008), desde el momento en que estas células comenzaron a seleccionar qué comían, adónde iban y con que otras células se asociaban.

PRIGOGINE (2004) en “*Las leyes del caos*” dice que este proceso debe nivelarse, y rescata los conceptos de “*tiempo*” e “*irreversibilidad*” para el mundo biológico. De esta forma, al aparecer la vida se originó una nueva categoría de existencia sobre la tierra: el ser viviente, que posee un tiempo de vida. Pero a la vez se creó la muerte, su irreversibilidad. La muerte sería el orden de los principios inorgánicos; la vida, por el contrario, la transgresión temporal de dicho orden. Lo interesante es el reconocimiento de que la vida comenzó con el establecimiento de la ordenación celular.

En definitiva, la célula constituye el principio de la vida, tanto en el cosmos como en el individuo aislado, y la formación de una nueva célula representa siempre la repetida superación de la frontera que separa los dos grandes atributos de todo ser: la frontera o límite entre la vida y la muerte. Este traspaso se halla sembrado de misterios, los cuales, aparentemente invisibles, se nos hacen visibles e interpretables cuando los hombres utilizamos nuevas ideas y nuevas formas de observación, hacen como diría CABALLERO BONAL que la noche no tenga paredes.

La célula inicialmente fue un dato de observación cuya estructura compleja fue objeto de estudio. Para comprender las posibilidades terapéuticas de la misma, profundizaremos en el “*clima histórico*”, en palabras de MARAÑÓN (1966), en el que se fundamenta este hecho, realizando una citobiografía médica, deteniéndonos en las etapas que consideramos necesarias para entender este nuevo paradigma de la célula como agente terapéutico y evaluar su futuro. Dichas etapas sobre la célula, que vamos a comentar en el discurso las he denominado de las siguientes maneras: la célula busca su sentido, se desnuda, es protagonista de su vida, es una esperanza maravillosa, se hace medicamento y se hermana con los fármacos, y por último la célula humana ¿podrá ser suplantada? Para ello, intentaré y me

esforzaré en ser “acoluto”, según GRACIÁN, esto es, me empeñaré en ajustarme a dichas etapas en las que he subdivido este discurso, y que con la benevolencia de todos ustedes espero desarrollar de la mejor forma posible.

## **Primera etapa: La célula busca su sentido.**

### ***Cuando buscan su pulso encuentran su vacío*** **Federico García Lorca**

El descubrimiento de la estructura celular está vinculado a la invención del microscopio, término dado por FABER a este instrumento amplificante, que aparece en 1590 en Middleburg, (Holanda), cuando HANS y ZACARIAS JANSSEN combinan dos lentes convexas en el interior de un tubo, para ampliar los objetos pequeños (CARRASCAL, 2007).

A partir de aquí se realizan diferentes modificaciones con el objetivo de ir perfeccionándolo. Destacaremos de aquellos inicios, el “*Occhiolino*” de GALILEO (1624); el de KIRCHER (1646) por su aplicación al diagnóstico de enfermedades, y los famosos microscopios simples de LEEUWENHOEK (1660) con el que descubrió los infusorios, las bacterias, los eritrocitos, los espermatozoides (vislumbrados por HAMM), etc. Hasta SALVADOR DALÍ en 1930 escribe: “*Penetrar en lo visible es para LEEUWENHOEK algo que concierne a la tecnología*” Y además añade “*El ojo de la razón cree haber descubierto los secretos de la materia y haber revelado su misterio al mundo*”. En definitiva el vacío lorquiano.

Después se realizaron mejoras que llevaron a la construcción del primer microscopio binocular por CHERUBINI (1722). El cual fue modificado por diferentes autores, entre los que destacamos los realizados por los hermanos JONES (1798), por NACHET (1850), y por ABBE (1886).

Las primeras observaciones realizadas a través de este instrumento se publicaron en 1625 en el libro “*Apiarum*” por CESI y STELLUTI; pero es en la obra “*Micrographia or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon*” de HOOKE (1665) cuando por primera vez aparece el término “célula”, utilizándola como celda al observar un corte de corcho. Dicho autor escribe “*Pude ver con perfecta nitidez que el fragmento aparecía totalmente perforado y poroso, recordando mucho a los panales de cera de las abejas*”. Por tanto, con la introducción del término de la célula HOOKE inicia su mito.

El anatomista MALPIGHI señaló la existencia en los vegetales de unos “*utriculi seu sacculi*” –odrecitos o saquitos- que GREEW, en 1672 denominó célula. Sin embargo, el concepto de célula de la Teoría Celular no había iniciado todavía su vida científica, porque en aquella época persistía la concepción estequiológica de que la “*fibra*” era el elemento básico y fundamental de los cuerpos vivientes, expuesta muchos años antes por VESALIO en su libro de “*De Humani corporis fabrica*”.

En 1680 CRISÓSTOMO MARTÍNEZ, en Valencia, utiliza el microscopio y realiza una notable contribución a la osteología de su época.

En 1774 WOLF utiliza de forma habitual el microscopio, y afirma que los glóbulos son los elementos constitutivos de las partes sólidas. DUTROCHET afirma en 1824 que la célula –para él aún “glóbulos”- es el único principio constitutivo de los dos reinos de los seres vivos, siendo así el verdadero precursor de la Teoría Celular.

Esta Teoría Celular naciente tenía que superar la influencia de BICHAT que en “*Anatomie générale appliquée à la physiologie et à la médecine*” (1801), sin la utilización del microscopio, establece que el tejido es el elemento último de los seres vivos. Si el tejido aparece como la última realidad, es inútil buscar más allá. Dicho autor, condena firmemente el uso del microscopio: “*Cuando se mira en la oscuridad, cada uno ve a su manera y en la medida en que resulte afectado*”. COMTE, le proporcionará la perfecta justificación filosófica “*El abuso de las investigaciones microscópicas y el exagerado crédito que todavía se suele prestar a un medio de exploración tan equivoco, contribuyen básicamente a dar una falaz apariencia de verdad a esta fantástica teoría (la Teoría Celular)*” Así como en sociología el individuo es una abstracción, dado que la realidad social elemental es el tejido familiar, en biología las células –las “*monadas orgánicas*”, como dice COMTE- son abstracciones.

A pesar de esta corriente, eminentes médicos y biólogos rehabilitan el microscopio, ya notablemente perfeccionado e inician el desarrollo de la técnica citológica que aplicarán metódicamente al estudio de los seres vivos. Esto fue lo que permitió una nueva estequiología biológica: la Teoría Celular. Y se pasó de la anatomía general sensualista o bichatiana a una anatomía general celular o histológica.

El botánico SCHLEIDEN es considerado el fundador de la Teoría Celular, que con la publicaciones de sus obras “*Beiträge zur Phytogenesis*” publicado en 1838 y “*Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik*” editada en Leipzig en 1842 establece que la célula vegetal es la unidad elemental constitutiva en la estructura de la planta.

SCHWANN, extendió esta teoría a todos los seres vivos, gracias a una cena que tuvo con SCHELEIDEN, quien le señaló la semejanza de la notocorda -que era la estructura que él estaba estudiando- con las plantas. Al publicar su obra “*Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und der Pflanzen*”, impresa en Berlín en 1839, proclamó su “*Theorie der Zellen*”, señalando que la estructura unitaria y común de todos los seres vivos, sean animales o vegetales, es la célula, en donde reside la vida.

De la unión de estos dos conceptos –la Anatomía Tisular de BICHAT y la Teoría Celular de SCHLEIDEN y SCHWANN-, nace la Histología, término acuñado por MAYER en 1819. La Histología estudiará los tejidos del organismo y estos estarán integrados por las unidades estequiológicas o células vivas. Esta concepción sistemática del organismo basada en la aceptación de la

constitución celular de los tejidos, precisaba adquirir significado fisiológico además de morfológico. HENLE y KOLLIKER, entre otros, lo llevaron a cabo.

En Granada, LÓPEZ MATEOS escribe durante el curso académico 1847-48, su “*Tratado de Histología y Ovología*”, editado en 1853, significó la plena recepción y asimilación de la Teoría Celular en España, encargando a su vez la compra del primer microscopio para la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

En 1855, VIRCHOW publicó su “*Patología Celular*”, en el que la enfermedad va a dejar de ser entendida como una alteración discrásica de humores, para interpretarse como una alteración de la célula. Años más tarde, en 1884 CARNOY editó en la Universidad Católica de Lovaina, la primera revista dedicada exclusivamente a la célula, bajo el título de “*La Cellule*”.

Sin embargo, a pesar de lo expuesto hasta ahora, la Teoría Celular estuvo expuesta a los más intensos ataques. Tuvo que defenderse en dos frentes opuestos. El primer frente fue el considerar las unidades tisulares estructurales supraordenadas más importantes que las células. CAJAL al postular la *teoría de la neurona* va a confirmar la Teoría Celular, haciendo de ese mito ya una realidad, que nos permite explicar a partir de ella la configuración textural del sistema nervioso.

El segundo ataque fue que existían unidades más pequeñas que la célula como partículas vivientes, por lo que era necesario desnudarla, aún más, para desvelar su interioridad y con ello reforzar la Teoría Celular.

## **Segunda etapa: La célula se desnuda.**

***Existo como soy; eso basta***  
***Walt Whitman***

Una vez que la célula se constituye como la unidad vital de los seres vivos. Surgen diferentes preguntas ¿Cómo es? ¿Cómo está constituida? ¿Es un elemento totalmente homogéneo?, o por el contrario ¿lo identifica su heterogeneidad? ¿Es una estructura simple? o ¿tan compleja que sería un misterio como nos apunta RASMUSSEN que pudiera funcionar? Estas y otras muchas preguntas se fueron realizando y contestando a lo largo de estos años y siglos por los estudiosos de la célula.

Para el análisis de esta segunda etapa vamos a basarnos en lo descrito según los textos de citología de distintas épocas, comenzando por el de CAJAL (1921), URTUBEY (1931), De ROBERTIS (1946), ORTIZ PICON (1947), GRUNDMANN (1967), PILET (1968) De DUVE (1988), PEREZ DE VARGAS (1992), ALBERST (2008) y terminando con el último publicado este año, el texto de COOPER (2010).

## **¿Cómo desnudaron los citólogos clásicos a la célula?**

Ellos la desnudaron y la describieron como es, al principio, utilizando el microscopio óptico como instrumento y el desarrollo de la técnica citológica como medio. CAJAL (1921) nos definió a la célula como “*la porción elemental dotada de vida*”. Por su parte, URTUBEY, la encuadra como “*una masa circunscrita de protoplasma diferenciado que encierra constantemente en un punto cualquiera de su cuerpo un organito especial, el núcleo*”. Dicha definición la realiza el autor en su libro “*Elementos de Histología*” que publicado en 1931, ese texto lo guardo en mi estantería con amor, como diría MENENDEZ y PELAYO, porque al envejecer conmigo me sigue siendo muy útil.

Las células se presentan de forma y tamaños variables, aisladas o agrupadas en colonias. Pero en todas ellas los caracteres fundamentales del contenido celular siempre presentan un plan estructural común a todas ellas.

¿Cuál es, este plan estructural común a todas las células? La célula estaba formada por un citoplasma, una membrana y un núcleo; imprescindibles para la realización de sus funciones vitales: el metabolismo y la reproducción.

El núcleo, aunque observado por FONTANA (1780), fue BROWN (1831) quien propuso su nombre. Es un corpúsculo constante a nivel central, de volumen, número y formas variables. Al ir desnudando a este núcleo se identificaron las estructuras que lo componen. Y así VALENTIN (1836) describió el *nucléolo*, FROMMANN (1865) la *membrana nuclear*, FLEMMING (1876) la cromatina, WALDEYER (1888) los cromosomas y WILSON (1896) los *cromómeros*. Todos estos elementos estaban incluidos en una sustancia aparentemente líquida, el plasma nuclear, que se denominó el *jugo nuclear* o *carioplasma*.

Aunque el término de *protoplasma* lo empleó PURKINJE (1840), fue realmente REMAK (1855) quien precisó que era el contenido de la célula. HANSTEIN (1880) utilizó el de *hialoplasma* y CARNOY (1884), finalmente, el término de *citoplasma*, el cual fue el que se generalizó.

En la zona periférica del citoplasma se describía -el *exoplasma*-, que CAJAL (1921) definió como una lámina transparente que envuelve exteriormente a la célula. A veces, se asocian y forman unas bandas de cierre descritas por BONNET, ZIMERMANN, COHN y PRENANT. Ya en aquella época, se describían la presencia de los pseudopodos, las pestañas vibrátiles, kinocilios y estereocilios como apéndices exoplásmicos.

Dentro del citoplasma se observaba el *mitoma* o *retículo* que estaba constituido por las *citofibrillas*, que poseían un papel esquelético y de sostén. Y así se describieron, las *epiteliofibrillas* (TELLO, RIO-HORTEGA), las *inofibrillas* (TELLO), las *miofibrillas* (APATHY), las *neurofibrillas* (BETHE, APATHY), y por último las *gliofibrillas* (WEIGERT, CAJAL).

Cerca del núcleo se observaba el *centrosoma* de BOVERI (1887), constituido por el *centríolo* (HEIDENHAIN, 1907) que se agrupaba en dos formando el *diplosoma* y que estaba colocado en el centro de la *centrosfera* (BOVERI, 1901) o *centroplasma* (HEIDENHAIN, 1907). Esta estructura tiene un

papel fundamental en los procesos de división celular. Ya en aquella época, EHRMANN, ZIMMERMANN y RIO-HORTEGA, sostienen la presencia centriolar en la base de implantación de los flagelos. Debido a que ya se sabía de la existencia del *aparato quinético* celular, que STRASBURGER (1888) denominaba el *Kinoplasma* y que estaba integrado por los *cilios* y *flagelos*.

Dentro del citoplasma de las células se describieron unos orgánulos que se les relacionó con el metabolismo. Se presentaban como unos corpúsculos que BENDA (1897) llamó *mitocondrias*, o como unos filamentos, que MEVES (1908) describió como *condriocontes*, y al conjunto de todas ellas *condrioma*. Así como el condrioma se presenta en todas las células animales y vegetales, los *plastos* descritos por STRASBURGER (1884) solo se visualizan en estas últimas.

En la mayor parte del citoplasma de las células es posible distinguir, a veces, unas vacuolas que vislumbró DUTROCHET (1824). Años más tarde, DANGEARD (1912) denominó *vacuoma* al conjunto de todas ellas.

Dentro del citoplasma y cerca del núcleo, se describió un *aparato reticular interno, intestino celular, o aparato de Golgi*. CAJAL (1921), lo situaba habitualmente en el "*polo mundial*" de la célula, es decir, cerca de la superficie que se relaciona con el mundo exterior, como veremos más adelante.

Por otra parte, McALLUM (1891), EBERTH y MÜLLER (1892) y SOLGER (1894) describieron unas estructuras filamentosas intensamente basófilas que GARNIER (1899) denominó *ergastoplasma*, en la porción basal del citoplasma de las células de las glándulas salivares humanas.

Por último, dentro del citoplasma se describió la existencia de los *microsomas* o enclaves de CARNOY (1884).

El mito del mundo subcelular descrito inicialmente en la célula, fue muy discutido a lo largo de esos años, por lo que se hacía necesario profundizar más en lo invisible para descubrir su auténtica realidad, y esto se pudo realizar gracias a la introducción del microscopio electrónico para el estudio de las células y los tejidos. Este hecho constituyó una etapa decisiva en el conocimiento de los componentes subcelulares, al comenzar a captarse su ultraestructura.

### **¿Cómo se entiende a la célula humana actualmente?**

El desarrollo de la microscopía electrónica se realizó gracias a las bases establecidas por THOMPSON, BROGLIE y BUSCH, que llevaron a KNOLL y RUSKA a construir en 1931 las primeras *lentes electrónicas*. RUSKA y BORRIES (1933), construyeron el primer microscopio electrónico y MARTON (1937) publicó las primeras imágenes ultraestructurales de preparaciones citológicas, con lo que nacía el mito de una citología ultraestructural. Con el impulso de la microscopía electrónica asociada a la centrifugación la citología morfológica experimentó un progreso espectacular.

GONZÁLEZ-SANTANDER (1999), en su libro nos indica que fue BRU al ampliar sus estudios en Zurich (1933), con SCHERRER, cuando se inicia la microscopia electrónica en nuestro país, ya que al regresar a España comienza a desarrollar la misma. El primer microscopio electrónico de transmisión que se instaló en España fue en 1946. La Sociedad Española de Microscopia Electrónica inicia su andadura, diez años más tarde, en 1956. Un año después, en 1957, es cuando se instaló en la Facultad de Medicina de Granada, el primer microscopio electrónico un Philips E.M.-100, a cargo de LÓPEZ GONZÁLEZ y de MENDOZA. EL microscopio electrónico de barrido que se desarrollo mucho después, cuando el sistema de televisión fue creado, se instaló en nuestra Facultad en 1981, de nuevo un modelo Philips, el S.E.M.-505, en el Departamento de Histología, a cargo de CAMPOS. Dicho microscopio se puede ver, hoy en día, en espera del deseado Museo de Medicina, situado en el hall de entrada de las salas de prácticas de nuestra Facultad.

Con estos instrumentos los citólogos como PALADE, PORTER, De DUVE, RODHIN, SJOSTRAND, De ROBERTIS, COSSLET, HIRSCH, TRILLAT, DUPOUY, Van BORRIES, ROHLER, HASHIMOTO, BLACKMAN, describen la intimidad última de la célula. Pero queremos llamar la atención, que esto no fue fácil, al contario planteó bastantes dificultades al intentar compaginar la descripción de los orgánulos clásicos con los obtenidos a nivel ultraestructural.

A la vez, a la citología clásica se le añadió una perspectiva molecular que fue ampliando el conocimiento de la célula, configurándose una citología bioquímica o molecular. LENHNINGER (1972) estableció una jerarquía de la organización molecular de la célula de mucho impacto en su tiempo. CAMPOS (1975), desde esa perspectiva, rescató para la célula, en el sentir de MONOD, dos propiedades paradójicas que caracterizan a los seres vivos: emergencia y teleonomía, y a través de ellas partiendo desde bases morfológicas y estructurales construye el funcionamiento químico-molecular de la célula viva.

Pero en estos años además, emerge con fuerza una nueva ciencia la “Genética”, que desde que BATESON definió sus objetivos en 1906, ha experimentado cambios espectaculares. El redescubrimiento de las leyes de MENDEL dió a conocer la transmisión de los caracteres hereditarios, pero sin lugar a dudas fue el estudio de la naturaleza y las propiedades del material hereditario lo que impulsó la genética. Al encontrarse dicho material dentro de la célula quedaron ambas ciencias también entrelazadas en una citogenética.

Por tanto, esta realidad de la *Biología Celular* moderna implica, como nos lo han recordado recientemente BECKER, KLEINSMITH y HARDIN (2007), el entretrejo de estas tres ramas en una única cuerda: la citología, la bioquímica y la genética. Debido a la extensión de cada una de estas ramas que integran la cuerda de la célula, y que sus fronteras y límites no están del todo bien definidas como afirman LACKIE & DOW (1989) y KORDON (1994), vamos a seguir el consejo de WILSON “la clave de cualquier problema biológico tiene que buscarse finalmente en la célula” como se indica en el texto

de Biología Celular de ALBERTS, BRAY, LEWIS, RAFF, ROBERTS y WATSON (2008), eso si con la perspectiva biosanitarias.

CAMPOS (1985) definió los estados no lesionales, -por tanto de base histológica-, desde esa perspectiva biosanitarias en que las células se comportan biológicamente, concretamente, en los: estados euplásticos, proplásticos y retroplásticos. Dichos estados celulares nos permiten comprender el substrato morfoestructural en el que asientan las lesiones, los mecanismos que conducen tanto a la formación como a la defensa y reparación de las mismas y las posibilidades terapéuticas y efectos microscópicos de determinadas técnicas farmacológicas, físicas y quirúrgicas.

El estado euplástico es el estado ortotípico o estado de salud “propriadamente dicho”, dicho estado o actividad como lo denomina FROST (1986) puede variar en distintas poblaciones celulares e incluso en una misma población celular. Para el estudio de la célula constituye un objetivo específico su indagación y sistematización.

### **La célula euplástica humana**

Es una célula eucariótica, por tanto constituida por una membrana, un citoplasma y un núcleo. NOMBELA (2007) describe a la célula como un ambiente definido en el que transcurren procesos vitales. Dicho ambiente lo tiene porque está rodeada por una *membrana plasmática*, que define la frontera con el exterior. Gracias a esta membrana existe una separación, que no aislamiento, ya que el intercambio es continuo y muy complejo, entre célula y el medio externo determinando la composición del citoplasma. En 1959, ROBERSTON, confirma con el microscopio electrónico la existencia de ella, describiéndola como una hojilla de estructura trilaminar. Está altamente ordenada, gracias a la articulación específica de las macromoléculas que la integran, formando un mosaico fluido propuesto por SINGER y NICOLSON en 1972, en el que las proteínas están insertadas en una bicapa lipídica. Esta fluidez permite entender las dos funciones fundamentales que ejerce la membrana. Estas son, la regulación del tráfico de sustancias, tanto hacia adentro (endocitosis) como hacia fuera de la célula (exocitosis), y la de recibir señales del medio exterior, a los que la célula habrá de responder adecuadamente.

El término de *endocitosis*, fue acuñado por De DUVE (1963) que incluía tanto la ingestión de partículas grandes (la fagocitosis), como la entrada de a través de vesículas pequeñas (la pinocitosis) que resultan ser esenciales para entender la permeabilidad celular.

Muchas de las proteínas de la membrana actúan como receptores, con lo cual la célula recibe todo tipo de señales exteriores. A través de sus receptores de membrana, la célula “sabe” cuándo puede llevar adelante los procesos que conducen a su multiplicación, cuándo debe hacerla, cómo se puede relacionar con las células vecinas o qué situaciones suponen un estrés al que debe hacer frente. El conjunto de receptores presentes en la membrana

de las células constituye una de las bases principales de la especialización celular.

En contacto con la lámina externa que constituye la membrana plasmática se describió una fina estructura de aspecto fibroso, la *cubierta celular* o *glicocálix*, término utilizado por BENNET (1956). Dicha cubierta está constituida por un manto de carbohidratos que desempeña un papel de barrera frente a microorganismos invasores y como marcadores implicados en la interacción célula-célula.

En esta membrana, se empezaron a determinar las diferenciaciones que ofrecía esta estructura. GRANGER y BACKER (1952) describieron los componentes ultraestructurales de las microvellosidades, una de las especializaciones que puede presentar la membrana. PORTER, (1956); SALPETER y SINGER, (1959) aportaron la estructura de los *desmosomas*, confirmando su naturaleza de puente celular. Y que, hoy en día, se incluyen dentro del gran capítulo de las uniones o interacciones entre las células. Las cuales pueden ser adherentes, ocluyentes o comunicantes. Además de estas uniones entre las células existen otras que interaccionan con la matriz (hemidesmosomas y contactos focales), en ellas, las integrinas juegan un papel singular. Estas uniones permiten unas interacciones directas entre las células que son críticas para el desarrollo y para la función de los organismos pluricelulares. Dichas uniones pueden ser transitorias o estables.

NOMBELA (2007) considera a la célula como soporte de vida, y es en el citoplasma donde ocurren tres procesos de vida:

El primero, los procesos que definen lo que llamamos metabolismo, todo un conjunto de cambios, químicos y físicos, de los materiales que la célula transporta a su interior y que son esenciales para desarrollar sus funciones.

En segundo, el citoplasma construye el soporte físico de los procesos fundamentales de obtención de energía y su transformación en formas aprovechables para la célula.

El tercer proceso es la síntesis de proteínas. Cada célula es portadora de millones de moléculas de proteínas que responden a una variedad notable de tipos, en función del número y la calidad de los genes propios de la especie. En la especie humana se pueden generar seguramente más de 100.000 proteínas diferentes. Además, existen procesos de degradación de las proteínas que son tan importantes como su síntesis, ya que permite el recambio de estas moléculas que es esencial para el funcionamiento de la célula.

Dentro del citoplasma nos encontramos con el *citosol* o *hialoplasma*, es el medio interno transparente de las células. Al microscopio electrónico aparentemente carece de estructura, es homogéneo y constituye el sobrenadante obtenido después de varias fases de ultracentrifugación, en el que se ha eliminado el material particulado. En él se producen numerosas

reacciones catalizadas por enzimas solubles y se desarrollan los procesos catabólicos y anabólicos dentro de las células.

El *citoesqueleto*, consiste en una red de filamentos de proteínas que se extienden por todas las células eucarióticas, proporcionando una armazón estructural, a modo de andamio que determina la forma celular y la organización general del citoplasma. Además, intervienen en el transporte intracelular, la movilidad celular, la mitosis y la meiosis. Según PORTER (1981) está formado por los siguientes componentes: los microfilamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos, que se mantienen juntos y unidos mediante proteínas accesorias a los orgánulos intracelulares y a la membrana plasmática.

Los *microfilamentos de actina* son las estructuras más pequeñas del citoesqueleto, sus filamentos poseen 7 nm de grosor. La actina es la proteína citoesquelética más importante de la mayoría de las células. HOLMES y KABSCH en 1990 determinaron la estructura tridimensional tanto de las moléculas individuales como de los filamentos de actina.

Los *filamentos intermedios* estudiados por LAZARIDES (1981), son un grupo heterogéneo de estructuras que se denomina así porque tienen un diámetro de 10 nm, intermedio entre el de los microfilamentos y el de los microtúbulos, y son las estructuras más estables del citoesqueleto. Hasta el momento se han descrito unas 50 proteínas de los filamentos intermedios. Se clasifican en seis grupos: Tipo I (queratinas ácidas); Tipo II (queratinas neutras o básicas); Tipo III (Vimentina, Desmina, Proteína ácida fibrilar glial, y Periferina); Tipo IV (Neurofilamentos: NF-L, NF-M, NF-H y la  $\alpha$ -internexina); Tipo V (Láminas nucleares A y B) y el Tipo VI (Nestina).

Los *microtúbulos*, son varillas rígidas y huecas de aproximadamente 25 nm de diámetro. Son estructuras dinámicas que están continuamente ensamblándose y desensamblándose. A estos microtúbulos se les denominan *microtúbulos lábiles*. Se componen básicamente de un único tipo de proteína globular, la tubulina. Los heterodímeros de  $\alpha$ - y de  $\beta$ -tubulina polimerizan para formar los microtúbulos que están constituidos por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un corazón hueco. En las células humanas, la mayoría de los microtúbulos se dirigen hacia fuera desde el *centrosoma*, que se localiza cerca del núcleo. El centrosoma se conoce ahora como un *centro organizador de microtúbulos*, porque a partir de él se inicia el crecimiento de ellos. La proteína clave en el centrosoma es la  $\gamma$ -tubulina.

Los microtúbulos son los responsables de diversos movimientos celulares, incluyendo el transporte intracelular y el procesamiento de las vesículas de membrana y orgánulos, la profusión de los axones de las neuronas, la separación de los cromosomas en la mitosis y el batir de los cilios y flagelos. Para ello requiere la existencia de proteínas motoras microtubulares: la dineína identificada por GIBBONS en 1965 y la quinesina por BRADY, VALE, REESE Y SHEETZ en 1985.

A diferencia de los microtúbulos lábiles, existen en la célula estructuras microtubulares que cuando alcanzan un determinado tamaño pierden la capacidad dinámica de ensamblaje y desensamblaje, constituyendo las denominadas *estructuras microtubulares estables*. Los centriolos, los cuerpos basales de cilios y flagelos y los componentes microtubulares del axonema de cilios y flagelos son ejemplos de microtúbulos estables. Para la estabilización de microtúbulos se requieren proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP). Se conocen un gran número de MAP que varían en función del tipo de célula. Entre ellas figuran MAP-1, MAP-2, *tau* y MAP-4.

Los *centrosomas*, fueron observados por FAWCETT (1959) con microscopia electrónica y están constituidos por un par de *centriolos*, orientados perpendicularmente entre sí, y rodeados por un *material pericentriolar amorfo*. BESSIS, en 1960 describió dicha ultraestructura. Los centriolos son estructuras cilíndricas constituidas por nueve tripletes de microtúbulos, de manera similar a los cuerpos basales de los cilios y flagelos.

Los *cilios* y los *flagelos* son prolongaciones de la membrana plasmática constituidas por una *axonema* formado por 9 dobletes de microtúbulos y un par de microtúbulos centrales (9+2), y un gran número de proteínas responsables del mantenimiento estructural y del movimiento. En este sentido, cabe destacar la presencia de los denominados brazos de dineína.

Las inclusiones paraplasmaáticas del tipo de pigmentos (endógenos o exógenos), sustancias de reserva (gotas lipídicas, acúmulos de glucógeno, etc.) y cristaloides son inclusiones citoplasmáticas temporalmente inertes fruto de la actividad de la célula.

Los ribosomas fueron descubiertos en 1958 por PALADE y supuso una revolución en el campo de la fisiología celular. Dichos orgánulos se encuentran libres en el citosol e intervienen en la síntesis de proteínas a partir de la unión de aminoácidos en un orden que está predeterminado por el ADN. Se caracterizaron como partículas subcelulares mediante ultracentrifugación de célula lisadas y normalmente se designan de acuerdo con su coeficiente de sedimentación: 80S para los de las células eucarióticas. Descripciones realizadas por HUXLEY y ZUBAY, junto con las de BOUBLIK y HELLMAN (1977) han contribuido a establecer el modelo tridimensional de ellos que están compuestos por dos subunidades distintas, compuestas por proteínas y ARN ribosómicos. La subunidad menor de los ribosomas eucarióticos es de 40S, contiene ARNr 18S y unas 30 proteínas; la subunidad mayor es de 60S y contiene los ARNr 28S, 5.8S y 5S además de 45 proteínas.

Dichos ribosomas, de los que pueden existir entre 5 y 10 millones en una célula en crecimiento, se pueden encontrar libres en el citosol o asociados a membranas. A veces, encontramos unidos varios ribosomas a través de una molécula de ARNm y a estas estructuras que fueron descubiertas por RICH, las denominamos *polisomas* o *polirribosomas*.

El *sistema de endomembranas*, está constituido por la membrana nuclear, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

El *retículo endoplásmico*, es un sistema intracitoplásmico de túbulos y sacos (cisternas) delimitados por una membrana lipoproteína, descrito por MARTIN y MORTON en 1956, se extiende desde la membrana nuclear por todo el citoplasma. En la célula existen dos tipos distintos de retículo endoplásmico que realizan diferentes funciones. Cuando en 1945, PORTER, CLAUDE y FULLAM redescubrieron el ergastoplasma, en un cierto número de células animales, y lo bautizaron con el nombre de retículo endoplásmico, en verdad lo que estaban hablando es del primer tipo de RE el *rugoso* por estar cubierto por ribosomas. El segundo tipo es el RE *liso* que no está asociado con los ribosomas y está implicado en el metabolismo de los lípidos.

Al iniciarse la era del microscopio electrónico, los problemas planteados por las estructuras golgianas empezaron a aclararse. DALTON, por una parte, y HAGUENAU y BERNHARD, por otra, en 1950 describieron en las células unas formaciones muy parecidas al aparato de Golgi de los primeros citólogos. Dicho *aparato de Golgi o complejo de Golgi*, funciona como una fábrica en la que las proteínas enviadas por el RE, se reprocesan y distribuyen para ser transportadas a sus destinos finales: los lisosomas, la membrana plasmática o la secreción. Por tanto el aparato de Golgi está implicado en procesar el amplio espectro de constituyentes que viajan a lo largo de la vía secretoria. GRASSÉ et al., en 1955, dieron a conocer la ultraestructura del *dictiosoma*, elemento integrante del aparato de Golgi, cada dictiosoma agrupa una serie de bolsas membranosas aplanadas (cisternas) y por vesículas asociadas. Un aspecto llamativo del dictiosoma es su polaridad tanto en la estructura como en la función. Las vesículas procedentes del RE forman el compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG) y entran por la cara *cis* convexa del dictiosoma, habitualmente orientada hacia el núcleo. Entonces, son transportadas por la zona media del dictiosoma, donde se añaden y eliminan azúcares, y salen por la cara *cóncava trans* donde se almacenan y distribuyen, en la denominada red *trans* del aparato de Golgi, para su reparto a los destinos finales en la célula.

Los *lisosomas*, fueron descubiertos por De DUVE en 1951, pero no fue hasta 1962 cuando NOVIKOFF y ESSNER le dieron su nombre. Son orgánulos de morfología diversa delimitados por membrana y que pueden contener más de 50 enzimas hidrolasas ácidas diferentes, capaces de degradar la materia orgánica. Los lisosomas funcionan como el sistema digestivo de la célula, sirviendo tanto para degradar el material captado del exterior como de digerir los componentes obsoletos de la propia célula.

Una de las funciones principales de los lisosomas es la digestión del material captado del exterior por la célula mediante la endocitosis. Las vesículas endocíticas se fusionan y forman los *endosomas* tempranos. El contenido de los endosomas tempranos es transportado a los endosomas tardíos mediante vesículas de transporte o cuerpos multivesiculares. La activación de las enzimas lisosomiales se produce tras la fusión del lisosoma con el endosoma tardío.

Una actividad fundamental de todas las células es generar energía metabólica, y son dos los orgánulos que están dedicados específicamente al

metabolismo energético y a la producción del ATP: las mitocondrias y los peroxisomas.

Las *mitocondrias* desempeñan un papel crucial en la generación de energía metabólica en las células eucarióticas. Dicha energía la obtienen por la degradación de los carbohidratos y de los ácidos grasos, que son convertidos en ATP por el proceso de la fosforilación oxidativa. Sabemos desde CHÈVREMENT en 1959 que las mitocondrias contienen ADN mitocondrial. Además contienen ARNs mensajeros, transferencia y mitorribosomas. Poseen un código genético propio diferente e independiente del nuclear.

La organización general de las mitocondrias, tal como nosotros la conocemos en la actualidad, fue descrita con microscopía electrónica por PALADE en 1952 y SJÖSTRAND en 1953. Tienen forma granular (ovalada) o filamentosa dependiendo de la posición que ocupan en la célula. Dichas organelas están constituidas por un sistema de doble membrana, denominadas membrana interna y membrana externa. Los pliegues de la membrana interna se denominan crestas mitocondriales y se extienden hacia el interior de la matriz, donde contiene el sistema genético mitocondrial así como los enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo. Cada uno de estos componentes desempeña un papel funcional distinto, siendo la matriz y la membrana interna los principales compartimentos funcionales de las mitocondrias. A diferencia de la membrana interna, la membrana externa mitocondrial es completamente permeable a las moléculas pequeñas, esto es así porque contiene unas proteínas denominadas *porinas*, que forman canales que permiten la difusión libre de moléculas menores de 1.000 daltons. La forma, el número, el tamaño y la distribución de las mitocondrias varían en función de la actividad de la célula y proceden siempre de la división de mitocondrias preexistentes.

En 1954, RHODIN descubrió en el túbulo contorneado proximal del riñón del ratón unos orgánulos de pequeñas dimensiones a los que denominó "microcuerpos". En 1967, De DUVE, llamó *Peroxisomas* a los mismos orgánulos, porque intervenía en la degradación del peróxido de hidrógeno. Dichos orgánulos, desde entonces han recibido múltiples nombres, como el de microperoxisomas efectuado por NOVIKOFF en 1972. Son orgánulos ovoideos citoplasmáticos pequeños, delimitados por membrana que contienen al menos 50 enzimas diferentes implicadas en diversas reacciones metabólicas. La mayoría de las células humanas contienen unos 500 peroxisomas.

El núcleo, estructura propia de los eucariotas, según NOMBELA (2007), es el ámbito de dirección celular porque es donde radica la dirección de todas las funciones celulares. Es un orgánulo muy complejo que contiene, el material hereditario, en forma de ADN, el genoma celular, y sirve de almacén de la información genética y como centro de control celular. La replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN ocurren en el interior del núcleo, y sólo la última etapa de la expresión génica (traducción) tiene lugar en el citoplasma. La presencia del núcleo, por tanto, permite que la expresión génica sea regulada por mecanismos postranscripcionales, como el *splicing* alternativo.

El núcleo contiene: el *nucleoplasma*, acúmulos de *heterocromatina*, la *eucromatina*, y unos cuerpos esféricos, los *nucléolos*. La heterocromatina está constituida por fibras de ADN superenrolladas, espacios intercromatínicos que separan los gránulos de heterocromatina y por los que circulan los filamentos de ADN poco condensados.

El núcleo está limitado por la *envoltura nuclear*, la cual está formada por dos membranas (interna y externa) separadas por un espacio, el *espacio perinuclear*. Esta membrana está interrumpida en determinados lugares, donde se organizan los *complejos del poro*. Dichos complejos están integrados por más de 30 proteínas distintas. La microscopia electrónica de dichos complejos ha permitido describir que están constituidos por ocho subunidades estructurales alrededor de un canal central. Este poro es la vía central que utilizan las proteínas y los ARN para atravesar la envoltura nuclear.

Un *armazón* que agrupa a las moléculas de lámina y la matriz nuclear mantiene la estructura del núcleo; este armazón comprende moléculas de lámina (Filamento intermedio del citoesqueleto nuclear, “*el nucleoesqueleto*”) que se asocian en una lámina adherida a la cara interna de la membrana interna de la envoltura nuclear, por proteínas fibrilares y una red fibrosa. Y por su cara interna, la lámina entra en relación con la heterocromatina periférica, que se tiñe fuertemente en microscopia electrónica.

La cromatina se condensa durante la mitosis para formar los cromosomas compactos metafásicos que se distribuyen a las células hijas. Durante la interfase, una parte de la cromatina (*heterocromatina*) permanece muy condensada y es transcripcionalmente inactiva; el resto de la cromatina (*eucromatina*) está descondensada y distribuida por todo el núcleo.

Las células contienen dos tipos de heterocromatina. La heterocromatina constitutiva está formada por secuencias de ADN que nunca se transcriben, como las secuencias satélites localizadas en los centrómeros de los cromosomas. La heterocromatina facultativa contiene secuencias que no se transcriben en la célula observada, pero sí se transcriben en otros tipos celulares.

Aunque la cromatina interfásica parece que se distribuye uniformemente. Los cromosomas realmente se disponen de manera organizada y se dividen en distintos dominios funcionales que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Eso fue sugerido por RABL en 1885, aunque no fue hasta 1984 cuando se confirmó por el grupo de MATHOG. Hoy sabemos que los cromosomas ocupan zonas definidas por su ocupación que están separadas por dominios intercromosómicos donde se cree que ocurre el procesamiento y el transporte del ARN.

Además de estas estructuras, en el interior del núcleo se han descrito otras formaciones, como las Motas, los cuerpos LPM y los cuerpos de CAJAL.

Las células eucarióticas han desarrollado un nucléolo a lo largo de su evolución, es una región nuclear que no está limitada por membrana. Se organiza alrededor de las regiones de los cromosomas que contienen los genes para los ARNr 5.8S, 18S y 28S, y por tanto es el sitio donde tiene lugar la transcripción y el procesamiento del ARNr, y el ensamblaje de las subunidades ribosómicas. Hoy se entienden como fábricas de producción de ribosomas. La microscopía electrónica revela que dicha región consta de tres compartimentos diferenciados. El compartimento más claro, *el centro fibrilar* contiene proteínas implicadas en la transcripción: ARN polimerasa I, ADN polimerasa I, factores de transcripción UBF (upstream binding factor) y la nucleolina. Alrededor de este está situado el *componente fibrilar denso* que contiene la fibrilarina asociadas a pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP) implicada en la escisión del pre-ARNr y en el ensamblaje postranscripcional de los prerribosomas. Por último, un tercer compartimento, que rodea al anterior, el *componente granular* que contiene los prerribosomas. Estos tres compartimentos posiblemente reflejan la progresión de las etapas de transcripción del ARNr, procesamiento y ensamblaje de ribosomas. Después de cada división celular, los nucléolos se forman alrededor de las regiones cromosómicas que contienen los genes para los ARNr, y por esta razón se denominan regiones o centros organizadores nucleolares (NOR).

Por tanto, en la mayoría de las células, los nucléolos que inicialmente están separados se fusionan para formar un único nucléolo. El tamaño del nucléolo depende de la actividad metabólica de la célula, siendo los nucléolos observados más grandes, en las células que presentan una gran actividad de síntesis de proteínas.

A pesar de considerar a la célula individualizada, este elemento está en comunicación con las células vecinas y el material extracelular que día a día está adquiriendo una importancia capital en el lenguaje y comunicación de las células. Por tanto, tendremos en un futuro no muy lejano que preguntarnos ¿Qué lugar ocupan en la Teoría Celular los componentes extracelulares existentes en los Tejidos? Esta pregunta, que es apasionante de analizar, lógicamente, se aleja del contenido del presente discurso.

### **Tercera etapa: La célula protagonista de su vida.**

***Siempre naces y mueres, siempre creces y vives***  
***Antonio Carvajal***

La muerte de un organismo, en nuestro caso el ser humano, es considerado como un suceso trágico. Pero a nivel celular, es paradójicamente un prerrequisito para la vida.

POTTEN y WILSON (2004), se preguntan ¿Cómo nosotros sabemos que una célula está viva o muerta? Ellos definen la vida de un ser vivo, en nuestro caso, la célula cuando es capaz de demostrar varias capacidades: el movimiento, el metabolismo, la percepción sensorial y la capacidad reproductiva. Y la ausencia de dichas capacidades define a la muerte celular. Sin embargo no resulta fácil saber cuando se inicia esa pérdida de vida.

De todas las capacidades, es la reproducción -la división celular-, la que se establece como esencial para considerar viva a la célula. Ya VIRCHOW en 1855 afirmó que una célula procede de otra célula, y formuló su celebre aforismo "*Omnis cellula e cellula*". Toda célula procede de una célula preexistente. Posteriormente STRASBURGER (1879) al demostrar que los núcleos proceden de otro núcleo, pudo escribir "*Omnis nucleus e nucleo*". Ya que la vida celular se inicia gracias a la capacidad de autoreproducción que poseen todas las células y la muerte es considerada, como mecanismo de seguridad para equilibrar cuando esta capacidad esté alterada.

La vida celular, como la nuestra, se inicia por un nacimiento, a través de la división celular, por tanto está implicada, como no recuerda FERRER (1940), *en el desarrollo y en la perpetuación de las especies*. En el hombre, además forma parte del proceso de crecimiento, como nos lo señala PEREZ DE VARGAS (1983), por medio del mecanismo *crecimiento-multiplicación*, basado en el aumento del número de células a través de la división, que permite que desde el huevo humano, lleguemos a ser lo que somos. Posteriormente pasa a unas etapas de diferenciación, maduración, envejecimiento y termina con su muerte. Lo importante de la célula, es que ella puede decidir, al igual que nosotros aunque no sea éticamente correcto, entre seguir viviendo o por el contrario morir programadamente. Este "*suicidio*" celular durante el periodo del desarrollo embrionario y fetal se realiza de manera ordenada y controlada, y parece hasta lógico y ortotípico. Una vez ya establecido el cuerpo, cada célula individual debe funcionar armónicamente, esto es, en homeostasis, tanto con las células vecinas que le rodean como con el organismo completo al cual pertenece. Esta pérdida de la homeostasis con el objetivo de seguir viviendo, a veces, hace que intervenga el suicidio programado.

Desde WEISMANN (1863) sabemos que en todo ser vivo, incluido el hombre, existen dos tipos especiales de poblaciones celulares: *las germinales*, el conjunto de células reproductoras y *las somáticas*, el resto de las células que integran al individuo. Por ello, la división celular en el hombre son de varios tipos: *mitosis, meiosis y amitosis*.

Como sabemos, la mitosis, término propuesto por FLEMMING (1882), es el tipo de división más frecuente de las células somáticas, también recibe el nombre de división somática típica o división celular indirecta. En ella, se produce un reparto equitativo del material nuclear y citoplasmático, originándose dos células diploides, con 46 cromosomas en la especie humana, que contiene los mismos caracteres hereditarios que la célula parental.

El segundo tipo de división celular, la meiosis, se encuentran en los organismos de reproducción sexual. Es la forma de división típica de las células germinales y su finalidad es producir gametos de dotación haploide, como pudo observar Van BENEDEN (1889). En ella se verifica un intercambio genético entre los cromosomas homólogos y una reducción a la mitad del número, pero a diferencia de la mitosis, no se lleva a cabo un reparto equitativo del material celular entre las células hijas, ya que en la gametogénesis masculina se forman

gametos con cromosomas sexuales diferentes, X e Y, y en la femenina el material citoplasmático pasa en su mayor parte a un sólo gameto, el óvulo.

Finalmente, es posible ver en la especie humana un tercer tipo de división celular de mecanismo rudimentario la directa o amitosis, en la que se produce un reparto desigual del material celular entre las células hijas.

## Ciclo celular

El periodo de vida de una célula está condicionado por unos procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular. Esto se repite sucesivamente en unas determinadas fases, que configura el denominado *ciclo celular*.

En la célula humana, este ciclo celular es más complejo y consiste en cuatro fases. Se agrupan en dos etapas: la *interfase* o etapa de la vida de la célula en la que no se divide y clásicamente considerada como etapa de reposo y que esta constituida por las *fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>* y la fase de *división celular* o *fase M*, que consiste en la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis por la que la célula se divide.

Las señales extracelulares –proteínas del tipo MCM ó factores de crecimientos- y el tamaño de la célula regulan la progresión del ciclo celular a través de unos puntos de controles específicos del mismo. Dichos puntos, son momentos del ciclo celular en los que la célula “se asegura” de que el proceso se ha desarrollado correctamente, provocando su detención, en caso contrario y activando su continuidad si la situación es fisiológicamente correcta. En el momento presente, son los siguientes: el *punto de restricción* situado en la fase G<sub>1</sub>, los *puntos de control del daño al ADN*, situados en G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>, el *punto de control G<sub>2</sub>* que impide la iniciación de la mitosis antes de la complejión de la fase S, y el *punto de control de ensamblaje del huso*, localizado al final de la mitosis.

Hoy sabemos que existen, además, distintos *reguladores de la progresión* del ciclo celular. Entre ellos, comentaré, a modo de ejemplo, el factor promotor de la maduración (MPF), que es un dímero constituido por la ciclina B y por la proteína quinasa Cdk1, es clave para regular el paso de G<sub>2</sub> a M.

La mitosis o fase M es la división celular propiamente dicha. Supone el reparto equitativo de los materiales generados entre dos células hijas, resultan de la división de la célula madre. A pesar de ser la etapa más corta, se diferencian cuatro fases distintas. En las que la morfología celular muestra con claridad el principal objetivo de la división celular, repartir con precisión las dos copias de cada cromosoma formando parte de los dos núcleos resultantes de la replicación. En esta fase los cromosomas, una vez duplicados, se condensan, lo que permite observarlos de forma patente, al igual que el dispositivo que asegura su reparto, el huso mitótico integrado por un conjunto de fibras (microtúbulos) y dos polos dispuestos en los extremos de la célula.

Este reparto de las copias de los cromosomas, hacia los extremos, acaba generando los dos núcleos hijos (cariocinesis), como preludio del paso final del reparto del material citoplasmático en las dos células hijas (citocinesis).

Una minoría de las células de la población de un organismo pluricelular se encuentran en fase de división. El resto se encuentran en estado de interfase. Cuando se completa la división, la célula empieza a realizar las capacidades de una célula viva, como hemos comentado anteriormente, y si está incluida en un organismo pluricelular, comienza un proceso de diferenciación que le lleva a adquirir y desarrollar las funciones propias del tejido en el cual está integrado. A veces, pasa por un estado de quiescencia o de reposo durante un tiempo determinado, pasado el cual vuelve a ingresar en el proceso de diferenciación y maduración. A partir de aquí, las células presentan un punto de transición que inicia la manera de morir.

### **Mecanismos de Muerte Celular**

Dos tipos de muerte celular o lesión celular irreversible se distinguen clásicamente desde una perspectiva morfológica, bioquímica y molecular: Apoptosis y Necrosis.

La apoptosis fue formulada conceptualmente por KERR, WILLIE y CURRIE (1972), como un fenómeno biológico básico, permanente, dinámico e interactivo que tiene por objetivo eliminar las células que ya no son necesarias por medio de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos. Dicho término deriva de la palabra griega que describe la caída de las hojas desde un árbol ó los pétalos de una flor, se ha usado sinónimamente, para bien o para mal, como nos recuerda LaCASSE et al., (2005) con el de Muerte Celular Programada formalizado por VAUX (2002). Se observa en células aisladas y en ausencia de reacciones inflamatorias y morían por medio de un “encogimiento” o “arrugamiento”.

Dicho mecanismo, se interpreta hoy en día, de acuerdo con NÜSSLEIN-VOLHARD (2009) no como un accidente sino como un tipo de muerte involucrada en diferentes procesos para eliminar las células que ya no son necesarias. Estos procesos acontecen en el desarrollo embrionario; en el mantenimiento de la homeostasis de las poblaciones celulares en los tejidos; en la defensa en las reacciones inmunitarias; en la eliminación de las células lesionadas por enfermedad o por agentes lesivos, y por último, en el envejecimiento.

EARNCHAW (1995), describe que el proceso de apoptosis ocurre en dos etapas: una etapa inicial o fase de inducción y transducción de señales y una etapa final o fase de ejecución. La fase de inducción, es donde la célula toma la “decisión” de entrar en apoptosis y al no presentar dato morfológico alguno que lo evidencie, resulta difícil de observar. En esta fase la célula integra los estímulos señales pro y antiapoptóticos tanto externas como internas. Por lo que, un determinado estímulo es capaz de iniciar la cascada de señales intracelulares necesarias para que la apoptosis tenga lugar. Estas señales vienen dadas por proteínas codificadas por genes (p53, c-myc, E2F,

NF- $\kappa$ B.) A parte de estos genes, también intervienen los genes de la familia Bcl-2 (como los Bcl-XL proapoptóticos: Bax, Bak; Bad, Bik) y las citoquinas de supervivencia (PERALES et al, 2007).

Se distinguen dos vías principales de transducción o transmisión de señales para inducir la apoptosis: la vía del receptor de muerte, y la vía mitocondrial. En la *vía del receptor de muerte* intervienen el subgrupo de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) (ASHKENAZI y DIXIT, 1998; DIEZ, 2000) que reconoce señales extracelulares que inducen la muerte celular. Actualmente se conocen cinco receptores de muerte diferentes: el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)1, el CD95 (Fas/APO1), la proteína mediada por apoptosis relacionada con TNF (TRAMP) y los receptores 1 y 2 del ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). *La vía mitocondrial* se inicia con la liberación del citocromo c de la mitocondria, el cual se integra en el “*apoptosoma*” junto, Apaf-1 y procaspasa 9 (JIA et al., 2001; CHEN y WANG, 2002). Esta estructura activa a la caspasa-9, la cual estimula a la caspasa-3 que induce la muerte celular. Se ha postulado otro mecanismo mitocondrial, el factor inductor de la apoptosis (AIF) (KLUCK et al., 1997; CASTEDO et al., 2002) que produce la rotura de los gradientes protónicos y eléctricos a nivel de la membrana mitocondrial interna.

La fase de ejecución, representa el momento en el cual todos los cambios morfológicos se hacen evidentes. El mecanismo central está constituido por una familia de proteasas, las “*caspasas*” (ALNEMRI et al., 1996), aunque en algunos casos se ha descrito también las “*calpinas*” (LaCASSE et al., 2005). Las caspasas pueden ser iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras son las primeras en activarse y éstas activarían a las efectoras. La caspasa-9, sería una iniciadora y la caspasa-3 una efectora. Las caspasas responden mediante activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o desactivación de diferentes sustratos celulares que provocan los cambios morfológicos de la muerte celular programada.

Las caspasas escinden a más de 100 proteínas celulares para inducir los cambios morfológicos típicos de la apoptosis. Entre las estructuras dianas de las caspasas, COOPER y HAUSMAN (2010), indican las siguientes: un inhibidor de ADNasa (ICAD) que intervienen en la fragmentación del ADN; las laminas nucleares, que interviene en la fragmentación nuclear; proteínas citoesqueléticas (actina, miosina,  $\alpha$ -actinina, tubulina, vimentina) que intervienen en la fragmentación celular y participan en la formación de ampollas en la membrana; y proteínas de matriz de Golgi que intervienen en la fragmentación del Golgi.

El proceso de muerte celular por apoptosis está caracterizado morfológicamente por diversas fases: 1) Las células que inician su muerte comienzan por una pérdida del contacto con sus células vecinas y se desprenden del tejido. 2) La condensación del núcleo y de la cromatina. 3) La condensación del citoplasma con marcada reducción del volumen celular, 4) Las mitocondrias liberan citocromo c al citoplasma y pierden potencial de membrana. 5) La fragmentación internucleosomal del ADN por parte de endonucleasas. 6) El burbujeo de la membrana celular y vesicularización del

contenido celular configurando los cuerpos apoptóticos. 7) Señalización a células vecinas para atraer a las células fagocíticas. Esta eliminación de las células apoptóticas está mediada por la expresión de señales denominadas “cómeme” presentes en la superficie celular. Estas señales incluyen a la fosfatidilserina, que aunque en células normales está en la cara interna, en las apoptóticas se expresa en la superficie celular donde es reconocida por receptores que expresan las células fagocíticas.

La necrosis, descrita por VIRCHOW, ha sido considerada por COTRAN et al., (2000) como una muerte accidental de células expuestas a condiciones extremas en su entorno o daños genéticos. Desde una perspectiva morfológica y bioquímica se considera como un mecanismo opuesto radicalmente a la apoptosis. Este tipo de muerte celular es un proceso pasivo que no requiere energía, ni síntesis proteica, y no está regulado por mecanismos homeostáticos. En humanos, la necrosis ocurre fundamentalmente como consecuencia de importantes cambios en las condiciones fisiológicas, como la hipoxia, isquemia, hipoglucemia, exposición a toxinas o metabolitos reactivos de oxígeno, temperaturas extremas o privación de nutrientes. Asimismo, dicho mecanismo de muerte ha sido involucrado en diferentes enfermedades de tipo neurodegenerativo como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, Esclerosis lateral Amiotrófica y Epilepsia (MELDRUM 2002). A pesar del papel fundamental que juega la necrosis celular en la patología, los hechos moleculares que acontecen durante su desencadenamiento permanecen todavía controvertidos y poco claros (SYNTICHAKI Y TAVERNARAKIS 2002).

COTRAN et al., (2000) desde una perspectiva bioquímica, distinguen diferentes mecanismos comunes en la mediación de la lesión celular y la muerte por necrosis independiente al agente provocador. Dichos mecanismos son: el agotamiento de ATP, el oxígeno y radicales libre derivados del oxígeno, el calcio intracelular y pérdida de la homeostasis de calcio, los defectos en la permeabilidad de la membrana y la lesión mitocondrial irreversible.

En los últimos 20 años, la apoptosis y la necrosis se han considerado como los dos tipos fundamentales de muerte celular. Sin embargo, MAJNO y JORIS (1995) proponen un nuevo paradigma: la *oncosis*. Estos autores indican que el término necrosis ha sido utilizado por los patólogos para designar la presencia de células y tejidos muertos en organismos vivos. A dicha necrosis se puede llegar por un proceso de apoptosis, morfológicamente caracterizado por el arrugamiento y la fragmentación de la célula, o por un proceso de oncosis caracterizado por una tumefacción o hinchazón celular del citoplasma celular y cariólisis.

TRUMP y BEREZESKY (1996) definieron tres fases en la respuesta celular ante una lesión de tipo letal: a) La fase preletal, b) La fase de muerte celular, y c) La fase de necrosis. Durante la fase preletal ocurren todas las modificaciones morfológicas y bioquímicas previas al “*punto de no retorno*” y que son potencialmente reversibles. Estas modificaciones pueden suceder mediante los patrones morfológicos descritos anteriormente, apoptosis u oncosis. Durante la fase de muerte celular tienen lugar la pérdida de la

integridad de la membrana plasmática caracterizada por la salida de las enzimas citosólicas al espacio extracelular (la lacticodehidrogenasa) y la captación de colorantes o fluorocromos de exclusión vital como el azul tripán o el yoduro de propidio, respectivamente. En la fase de necrosis tienen lugar los fenómenos degradativos celulares comunes a los procesos de apoptosis u oncosis, con la excepción que durante la apoptosis in vivo dichos cambios ocurren en el interior de fagolisosomas de las células parenquimatosas o mesenquimatosas adyacentes.

En estos procesos, como acabamos de describir la alteración del volumen celular constituye una constante en ellos. Es sabido que las células tienen la capacidad de reajustar su volumen mediante dos mecanismos: *la disminución regulada de volumen* (RDO) o por *el aumento regulado del volumen* (RVI) (OKADA et al., 2001). Conocemos también, que en determinadas situaciones fisiopatológicas, las células muestran alteraciones del volumen celular persistentes que no pueden ser reguladas. Esta incapacidad en la regulación del volumen celular ha sido implicada en el inicio y ejecución en un tipo u otro de muerte celular (BARROS et al., 2001; OKADA et al., 2001).

En este sentido, MAENO et al., (2000) sugieren el concepto de descenso del volumen apoptótico (AVD) para describir la alteración en el volumen celular característica de la muerte celular por apoptosis que ocurre sin la activación de RVI. En contraposición, el concepto de incremento persistente de volumen asociado a la necrosis (NVI) u oncosis ha sido asociado a una incapacidad de activación del mecanismo de RVD (BARROS et al., 2001). En conjunto, estos hechos indican que la regulación del volumen celular y la maquinaria molecular e iónica intracelular implicada en dicho fenómeno (OKADA et al., 2001), juegan un papel fundamental en el inicio, progresión y ejecución de los diferentes mecanismos de muerte celular.

Por tanto, la pérdida de homeostasis iónica intracelular se encuentra dentro de los mecanismos involucrados que culminan con la lesión celular irreversible o muerte celular (BUJA et al., 1993; YU et al., 2001). Esto sugiere que los iones pueden jugar un papel fundamental en el proceso de irreversibilidad de la lesión celular (ZABITI, 2002).

En este sentido, nuestro Departamento de Histología inició y desarrolló el estudio con microscopía electrónica analítica del comportamiento iónico intracelular en células en cultivos, como posteriormente comentaremos, con el objetivo de establecer patrones iónicos de los diferentes mecanismos de muerte celular. Y así establecimos los indicadores iónicos intracelulares de cada tipo de muerte celular. (FERNÁNDEZ-SEGURA et al., 1999a, CRESPO et al., 2001; ARREBOLA et al., 2005 y 2006; ALAMINOS et al., 2007).

#### **Cuarta etapa: La célula una esperanza maravillosa.**

***Condenada a querer vivir***  
**Chantal Maillard**

Para mantener el número constante de células en los tejidos y órganos adultos, la muerte celular debe estar equilibrada por la proliferación celular. Para mantener este equilibrio, la mayoría de los tejidos contienen células capaces de proliferar a medida que sea necesario reemplazar a las células que han muerto. Estas células constituyen una subpoblación que hoy en día reciben el nombre de células madre.

Estas células han adquirido actualmente gran importancia. MINGOTE y SÁNCHEZ RON (2008) en "*Viva la Ciencia*", de una forma desenfadada, sugieren que el objetivo de la mayoría de las investigaciones actuales pretende dilucidar los métodos de obtención y mecanismos de acción de las células madre. Constituyéndose, en el nuevo "*El Dorado*" en las investigaciones biomédica. Esto es así, porque ellas son la fuente necesaria para poder llevar a cabo la Terapia Celular y la construcción de tejidos artificiales mediante las técnicas de Ingeniería Tisular.

Una célula madre es aquella que tiene gran capacidad de dividirse, en una división asimétrica, y diferenciarse en distintos tipos de células más especializadas (SMITH, 2006), no sólo morfológicamente si no también a nivel funcional.

Las células madre fueron identificadas por primera vez en el sistema hematopoyético por McCULLOCH y TILL en 1961, cuando mostraron que células aisladas derivadas de la médula ósea del ratón, podían proliferar y generar múltiples tipos diferenciadas de células sanguíneas. Cuando KLEINSMITH y PIERCE (1964) establecieron el origen de los teratocarcinomas, y propusieron el concepto de célula troncal. A ellas se les dió el nombre de troncales porque podían dar origen a los múltiples tipos de tejidos que se encontraban en los tumores (STEVENS, 1983).

Diferentes autores, en la década de los ochenta, como LAJTHA, POTTEN, LOEFFLER, WRIGHT y HALL, definieron a las células madre existentes en un tejido: como unas células indiferenciadas, capaz de proliferar, capaz de automantener la población tisular a la cual pertenece, capaz de producir un número grandes de células hijas diferenciadas con las características funcionales específicas, capaz de regenerar el tejido después de una lesión y por último ser capaz de generar células progenitoras. Y así establecieron tres categorías en las poblaciones celulares: células madre, células en transito y células maduras.

Los trabajos de EVANS y KAUFMAN y por MARTÍN en 1981 establecieron las bases, de forma casi definitiva y paradigmática, para el desarrollo de las metodologías necesarias para generar células madres embrionarias. A través de ellas, los grupos de THOMSON et al.; SAMBLOTT et al., en 1998 identificaron la células madre o troncal embrionaria humana. Este descubrimiento constituyó el último gran mito que sobre las células se realizó en el siglo pasado. A partir de ese momento, las progenitoras celulares han sido presentadas como la gran *esperanza terapéutica* del nuevo siglo. La utilidad potencial de estas células es enorme, ya que multitud de patologías serán tratadas en el futuro por medio de la *Medicina Regenerativa*. Tanto

repercusión tiene el tema que el *Instituto Nacional de Salud Americano* a fecha de 26 de mayo de 2009 había recibido aproximadamente 49.000 comentarios interesados por el tema, de grupos de pacientes, sociedades científicas, instituciones académicas, organizaciones médicas, organizaciones religiosas y ciudadanos. Por otra parte, al realizar una búsqueda en *Pubmed* al introducir el término células madre aparecen un total de 37.767 publicaciones; y si nos introducimos en el archiconocido *Google* aparecen un total de 20.100.000 entradas sobre el tema, ambas referencias fechadas el 14 de febrero 2010. Estos ejemplos constituyen una buena prueba de las expectativas que ellas han suscitado.

Las células madre ó troncales se definen, de acuerdo con WEISSMAN (2000) de manera puramente funcional como unidades biológicas capaces de autorregenerarse de forma ilimitada o prolongada y de poder diferenciarse a múltiples estirpes celulares. Dichas células se pueden clasificar de distintas formas:

Atendiendo a su potencialidad, es decir, a su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares, SMITH (2006) y MONTALVO (2008a) las tipifican en:

1. *Totipotenciales*: Son aquellas capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: sistema nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios). En sentido estricto, solamente los estadios iniciales del desarrollo (zigoto, blastómeras y células de la mórula) constituirían células madre totipotenciales.
2. *Pluripotenciales*: Son aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en el organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), incluyendo las células germinales. Las células pluripotenciales son las del polo embrionario del blastocisto.
3. *Multipotenciales*: Serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, endodermo o mesodermo. Existen numerosos tipos de células multipotenciales en el organismo adulto y en el feto, destacando, las de la médula ósea, que pueden diferenciarse a eritrocitos, leucocitos o plaquetas.
4. *Unipotenciales*: Tienen la capacidad de formar un único linaje celular. Por ejemplo: células madre epiteliales de la capa basal de la epidermis.

Dependiendo de la etapa de la vida, en la cual podemos obtener a las células madre, se les tipifica como: células embrionarias, células adultas, células del cordón umbilical y células fetales del líquido amniótico.

### **Células madre embrionarias**

Permiten al embrión generar todos los tejidos que existen en un organismo adulto. No existen en personas adultas, tan solo en embriones humanos. Tienen capacidad de proliferación ilimitada y pueden generar cualquier tipo de tejido e incluso un individuo completo. Son inmunológicamente distintas en cualquier persona, por lo que provocan los mismos problemas de rechazo que un trasplante de órgano convencional

Dichas células madre embrionarias se pueden obtener a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio (EVANS y KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1998), o bien, de la cresta gonadal (RESNICK et al., 1992; SHAMBLOTT et al., 1998). Las células madre embrionarias de la masa celular interna del blastocisto son pluripotenciales, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo, incluyendo tejidos somáticos (corazón, hígado, etc.) y germinales (ovocitos y espermatozoides) (GEIJSEN et al., 2004).

Estas células madre embrionarias para definir su carácter troncal, según ALONSO (2003) se pueden reducir a dos: que las células madre embrionarias se puedan cultivar *in vitro* y que se puedan expandir de forma indefinida *in vitro* manteniendo el carácter indiferenciado característico de las que se originaron.

En la actualidad, se ha logrado obtener líneas celulares madre embrionaria humanas a partir de una única célula de la Masa Celular Interna. Al principio se utilizó como sistema de cultivo fibroblastos embrionarios de ratón, pero fueron sustituidos por fibroblastos humanos como fuente de factores de crecimiento para dichas células (ZHANG et al., 2003). El Instituto Nacional de Salud Americano a fecha 14 de febrero de 2010 tienen establecidas 43 líneas registradas, 99 en evaluación y 236 peticiones para comenzar su estudio en distintos hospitales, laboratorios y casas comerciales del país. En España, también se han establecidos líneas celulares embrionarias, iniciándose por las Val-1, Val-2. Dichas líneas expresan los perfiles normales de expresión de proteínas de superficie SSEA-4, Tra1-60, Tra 1-81 y el marcador de células pluripotentes Oct-4. Además estas células expresan altos niveles de telomerasa como indicador de que tales células tienen capacidad indefinida de división y proliferación.

Una vez establecidas las líneas celulares, lo verdaderamente importante desde un punto de vista clínico es saber si tales células madre embrionarias tienen un verdadero potencial pluripotente. Y si lo tienen, conocer si se pueden diferenciar de forma dirigida y homogénea *in vitro* con objeto de poder ser implantadas, una vez diferenciadas, e integrarse en el organismo enfermo. Estas se han diferenciado a células correspondientes a las tres hojas blastodérmicas: ectodermo, mesodermo y endodermo; tales como cardiomiocitos, células neurales, hepatocitos, endotelio y precursores hematopoyéticos.

El mantenimiento del comportamiento pluripotencial plástico de las células madre depende en último término de reguladores autónomos celulares modulados por señales externas. Las señales externas que controlan el destino

de estas células colectivamente forman el microambiente en el que proliferan las células madre embrionarias. A este microambiente se le denomina “*nicho*” (WATT y HOGAN, 2000; TSAI et al., 2002). El concepto de nicho se describió por primera vez en el tejido hematopoyético. Los condicionamientos del nicho son esenciales para el proceso de transdiferenciación y transdeterminación (EGUCHI y KODAMA, 1993). Es conocido que la interacción de las células troncales con la matriz extracelular mediada por las integrinas determina la expresión de los genes BMP-4 y Wnt-1 que genera la diferenciación hacia mesodermo o neuroectodermo, respectivamente. Por eso se piensa que para que se produzca un desarrollo adecuado y dirigido de las células troncales se requiere no sólo factores solubles sino elementos de la matriz extracelular (CZYZ y WOBUS, 2001).

Por tanto, la capacidad troncal de las células madre embrionarias del embrión temprano parece depender de una combinación de los niveles de expresión de genes reguladores intrínsecos y de factores ambientales extrínsecos que tiene también capacidad reguladora (ROSSANT, 2001).

### **Células madre adultas**

Este tipo existe en casi todos los tejidos humanos adultos y permiten la regeneración y la reparación de los mismos. Son células multipotenciales o unipotenciales. Son inmunológicamente compatibles con el individuo, pues pertenecen a sus propios tejidos, por lo que no existe posibilidad de rechazo cuando se implantan en el organismo. Su potencial de división es enorme, pero no infinito: pueden producir un gran número de células hijas pero acaban muriendo. Tienen una capacidad proliferativa y un potencial de diferenciación menores que las células madre embrionarias (PROSPER, VERFAILLIE, 2003 y RAFF, 2003).

Se han identificado diferentes tipos de células madre adultas, desde las clásicas células madre hematopoyéticas, hasta las que se han descrito recientemente.

#### *Las células madre de la médula ósea*

Existen diferentes tipos de células madre en la médula ósea: hematopoyéticas (HSC), mesenquimales (MSC) (PITTENGER et al., 1999), las llamadas “Side Population Cells (SP) (ASAKURA et al., 2002) y últimamente las Células Progenitoras Adultas Multipotenciales (MAPC) (JIANG et al., 2002).

Las *células madre hematopoyéticas* (HSC) han sido identificadas tanto *in vitro* como *in vivo* por varios laboratorios y son las primeras que se han utilizado clínicamente. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ha demostrado definitivamente que existen células madre hematopoyéticas en la médula ósea y en la sangre periférica.

Independientemente del potencial hematopoyético que poseen, se ha descrito, en la actualidad, su potencial de diferenciación bajo determinadas circunstancias para diferenciarse a células musculares cardíacas (ORLIC et al.,

2001), a hepatocitos (LAGASSE et al., 2000 y KORBLING et al.,2002), a endotelio o a tejidos derivados de las tres capas embrionarias (KRAUSE et al., 2001), a músculo esquelético, neuronas adultas así como células de la glía, y de contribuir a otros tejidos como el epitelio pulmonar, gastrointestinal, renal o la piel (MARTIN-RENDON y WATT, 2003). Existen datos, sin embargo, que lo contradicen (BALSAM et al., 2004).

Las *células madre mesenquimales*, también denominadas *células madre estromales* o MSC, están contenidas en la médula ósea y cumple lógicamente, los tres criterios que según HORWITZ y BLANC (2005), fueron definidos por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular para ser consideradas este tipo de células. En los últimos años se han descrito distintos marcadores de superficie que han permitido identificar y aislar a dichas células, tales como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106. Múltiples estudios han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que estas células capaces de diferenciarse a células procedentes de tejidos mesodérmicos como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos (PITTENGER et al., 1999).

Las llamadas "*Side population cells (SP)*" han sido aisladas tanto a partir de médula ósea como del músculo. Son capaces de diferenciarse a HSC en humanos, roedores y otras especies (ASAKURA et al., 2002) y podrían diferenciarse, incluso, a células con características de músculo cardíaco y endotelio en un modelo murino de infarto de miocardio.

Últimamente han sido descritas en la población de la médula ósea, las *células adultas progenitoras multipotenciales* (MAPC) (JIANG et al., 2002). Son auténticas células pluripotenciales con una capacidad de diferenciación muy similar a las de la célula madre embrionarias. Aisladas a partir de médula humana y de ratón, son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin aparente envejecimiento, y no expresan CD34, CD44, MHC I, MHC II, CD45 y c-kit; si bajos niveles de Flk-1, Sca-1 y Thy-1 y altos de CD13; SSEA-1 (ratón/rata) y SSEA-4 (humano). Al igual que en las células madre embrionarias, en las MAPC se destaca la activación de los factores de transcripción Oct-4 y Rex-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado. *In vitro*, las MAPC se diferencian a tejidos derivados del mesodermo, como hueso, cartílago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio, hepatocitos, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos no solo fenotípicamente sino funcionalmente.

#### *Otras fuentes de células madres adultas*

Cada vez más, se han descrito la existencia de otras fuentes de células madre adultas con capacidad pluripotentes, a continuación expondremos algunas.

En 1992, REYNOLDS Y WEISS cultivaron por primera vez progenitores o precursores neuronales como neuroesferas. Estas estructuras representan agregados o colonias de células heterogéneas con proporciones variables –de

células madre neurales y precursores bi o unipotentes-, capaces de autorrenovarse y de diferenciarse tanto a neuronas maduras, como a astrocitos y glía. Las áreas neurogénicas fundamentales son la zona subventricular (SVZ), el bulbo olfatorio y el hipocampo (DOETSCH et al.,1999), habiéndose identificado en el cerebro humano las células madre neurales como una subpoblación de astrocitos presentes en la zona subventricular. En 2001 se adjudicó una patente a NeuralStem<sup>R</sup> (Gaithesberg, Marylan, EEUU) para un método de “aislar, propagar y diferenciar eficientemente en cultivo, células madre neurales de mamíferos, incluidos el hombre, para generar grandes cantidades de neuronas”. Los estudios in vivo en modelos experimentales han demostrado que las células madre neurales o neuroesferas, al ser trasplantadas en diferentes regiones del cerebro, son capaces de adoptar las características del nuevo microambiente e integrarse con el resto de células (CLARKE y FULLER, 2006).

En *el músculo* las células madre se conocen como *células satélites* y, aunque normalmente se encuentran en estado quiescente, cuando se produce un daño muscular son capaces de proliferar y diferenciarse con el objetivo de reponer las fibras dañadas (SEALE y RUDINICKI, 2000). Su potencial está limitado a la producción de nuevas fibras musculares, aunque algunos estudios recientes sugieren que en situaciones experimentales concretas este potencial pudiera ser superior, de manera que darían lugar a otros tipos de tejidos, como células hematopoyéticas.

Además, es posible identificar en el músculo esquelético otro tipo de células las denominadas *MDSC* (muscle derived stem cells). La potenciabilidad de estas células es muy superior a las células satélites, ya que se han diferenciado *in vitro* e *in vivo* a endotelio, músculo y células del linaje neuronal (QU-PETERSEN et al., 2002).

En la capa basal de la *epidermis* humana, desde los trabajos clásicos de POTTEN (1974) al definir la Unidad Epidérmica Proliferativa, se localizan las células madres epidérmicas, que fueron motivo de estudio de mi Tesis doctoral en 1983. Actualmente sabemos que existen dos tipos de queratinocitos con capacidad proliferativa: las *células madre epidérmicas* con una capacidad proliferativa ilimitada y las *células amplificadoras transitorias* o TAC, con una capacidad proliferativa más limitada (JANES et al., 2002).

Además de esta localización en la epidermis de la piel propiamente dicha o piel interfolicular, JORCANO (2009) señala su existencia, también, en el *bulge* de los folículos pilosos y en la base de las glándulas sebáceas. En condiciones de homeostasis normal estas regiones se mantienen a partir de sus propias células, pero en determinadas circunstancias, cada una de estas tres poblaciones de células madre son capaces de generar toda la epidermis.

En la epidermis humana y murina se han aislado células madre con capacidad de diferenciarse a células especializadas procedentes de dos capas embrionarias distintas: a neuroectodermo (neuronas y células de la glía) o a linajes mesodérmicos (adipocitos y músculo liso). Dicha potencialidad ha sido

demostrado a nivel clonal, pero no existen pruebas de una multipotencialidad *in vivo* y tampoco que los tejidos diferenciados sean funcionales.

Trabajos recientes sugieren que es posible aislar en el *músculo cardíaco células madre cardíacas multipotenciales* capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a cualquiera de los tejidos necesarios para reconstruir un corazón dañado, esto es, endotelio, músculo liso y músculo cardíaco (BELTRAMI et al., 2003). Incluso más sorprendente es el hecho de que dichas células son fácilmente identificables en el corazón gracias a la expresión de c-kit junto con la ausencia de expresión de marcadores de línea (c-kit+ Lin-).

En la región del limbo corneal se han descrito las *células madre corneales*, en la zona de transición entre la córnea y la esclerótica, tienen todas las características de las células madre, ya que poseen una gran capacidad de renovación, que se mantiene a lo largo de la vida, y son capaces de originar células hijas que pueden sufrir un proceso de diferenciación terminal a células especializadas. Sin embargo, no se ha podido demostrar que estas células sean pluripotentes y parece que solo dan lugar a células del epitelio corneal y conjuntival. Actualmente no existe un marcador biológico definitivo de las células madre del limbo corneal, aunque se han propuesto varios, como la alfa-enolasa, y, más recientemente, el factor de transcripción p63, aunque pueden aparecer en otras células.

### **Células madre del cordón umbilical**

Son obtenidas a partir de células indiferenciadas del cordón umbilical del recién nacido, y presentan características fenotípicas intermedias, elevada capacidad de proliferación celular pero no son totipotenciales. Son inmunológicamente distintas de cualquier persona, por lo que provocan los mismos problemas de rechazo que un trasplante de órganos convencional. En el futuro, podrían almacenarse para su eventual uso autólogo. Ya existen Bancos de Cordones Umbilicales públicos y privados cada vez más frecuentes que realizan dicho almacenamiento. Por ello, el cordón umbilical se ha convertido en un elemento de interés para la medicina regenerativa, ya que constituye una fuente importante de células madre. Sin embargo, sólo cuatro casos aparecen haber sido autotrasplantados procedentes de Bancos privados de los más de 8000 trasplantes con células madre del cordón umbilical registrados en todo el mundo.

Hasta el momento, se han identificado cuatro fuentes de células madre en el cordón umbilical: los *anmioblastos* (MIKI et al., 2005; SANMANO et al., 2005), las *células progenitoras hematopoyética de la sangre del cordón umbilical* (YE et al., 1994), las *células madre vasculares* de la vena umbilical donde nos encontramos las *subendoteliales* (ROMANOV et al., 2003; KESTENDJIEVA et al., 2008), y las *endoteliales* o *célula HUVEC* (ELGIO et al., 1975; ISHISAKI et al., 2003; RODRÍGUEZ-MORATA et al., 2008). Y, por último, las *células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical*, las cuales fueron por primera vez aisladas y cultivadas *ex vivo* por McELREAVEY et al., en 1991, y que están constituidas, según TROYER y WEISS (2008), por tres poblaciones celulares distintas: Células madre *perivasculares*; Células madre

de la zona *intervascular* y, por último, Células madre de la región *subamniótica*. Estas poblaciones presentan distinto grado de diferenciación celular, potencial de diferenciación y capacidad proliferativa.

Todas las células madre de la gelatina de Wharton son células madre mesenquimales (KARAHUSEYINOGLU et al., 2007; LU et al., 2006, CONCONI et al., 2006; BAKSH et al., 2007; SARUGASER et al., 2005; WANG et al., 2004; WU et al., 2007; CAMPARD et al., 2008) y poseen características similares a las células mesenquimales adultas. Expresan en superficie diversos marcadores característicos de las células mesenquimales (SH2, SH3; CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD166); y son negativos para marcadores del linaje hematopoyético (CD31, CD34, CD38, CD40 y CD45). Tienen capacidad para diferenciarse a la línea osteogénica, adipogénica, condrogénica como específicamente lo hacen las células mesenquimales adultas.

### **Células madre fetales del líquido amniótico**

Recientemente se ha descrito la posibilidad de obtener células madre pluripotentes del líquido amniótico. Las células madre del líquido amniótico representan, como nos indica POZZOBON et al., (2010), alrededor del 1% de la totalidad de células en cultivos de amniocentesis humana obtenidas por diagnóstico genético prenatal y pueden ser identificadas por ser positivo a la inmuno selección del antígeno c-Kit (CD117).

Constituyen una población de células madre en términos generales multipotentes ya que pueden diferenciarse hacia varios tipos celulares. De COPPI et al., (2007) las ha diferenciado en líneas celulares de las tres capas embrionarias.

Este grupo de células pueden ser expandidas a ritmo constante en cultivos, tienen un tiempo de duplicación de 36 horas y no necesita ninguna capa alimentadora. No evidencian crecimiento tumoral. Son positivas a un número de marcadores de superficie característicos de células madre mesenquimal y/o neuronal, pero no a los de las células madre, como CD29, CD44 (receptor de hialurano), CD73, CD90, y CD 105 (endoglina). Las células madres del líquido amniótico humanas son positivas para el antígeno SSEA-4 también expresados en las células madre. Además, más del 90 % de las células expresan el factor de transcripción Oct-4, el cual ha sido asociado con el mantenimiento del estado de indiferenciación y de pluripotencia de las células madre y germinales embrionarias.

Dichas células pueden jugar un papel importante en el campo pediátrico, en defectos estructurales diagnosticados prenatalmente, ya que existe la posibilidad de obtener células homologas al mismo tiempo de la prueba: Las células fetales podrían ser recogidas, cultivadas y manipuladas *in vitro*, mientras continua el embarazo y al final del mismo serian utilizadas como injertos usando la ingeniería tisular para la reconstrucción postnatal. Además pueden ser almacenadas para un uso futuro.

El uso de las células madre del líquido amniótico y las células madre pluripotenciales inducidas pueden ser utilizadas como nuevos protocolos para el tratamiento de enfermedades y malformaciones congénitas sin los problemas éticos.

## **Transdiferenciación Celular**

Una vez, analizados los tipos de donde obtenemos las células madre o troncales. Es importante señalar que cada vez es más frecuente encontrar trabajos científicos en donde se hace referencia a la *transdiferenciación* celular, entendida como la diferenciación de una célula madura en una célula de otro linaje sin que ésta tenga que revertir a célula madre progenitora (THOWFEEQU et al., 2007). La transdiferenciación de una célula madura a otra célula diferenciada puede deberse: 1) A una mutación en la secuencia de los nucleótidos del ADN, 2) A alteraciones epigenéticas, o 3) A otros factores ambientales que intervienen en los cambios que se producen en la expresión génica. Esto está en contraste con el proceso de diferenciación, el cual involucra una serie de etapas mediante las cuales una célula inmadura indiferenciada modifica su fenotipo y su morfología para convertirse en una célula adulta (Célula diferenciada). De esa manera, la célula podrá alcanzar una estructura y función especializada (SLACK, 2002). En resumen, inducir la transdiferenciación de células diferenciadas con un fin terapéutico, puede ser importante en la medicina regenerativa ya que se evitarían, por un lado, los problemas éticos y oncológicos que presentan las células embrionarias, y por otro lado, la dificultad para obtener células madres adultas.

Una importante línea de investigación que llevan a cabo, actualmente, el grupo de Ingeniería Tisular de nuestra Universidad que dirige CAMPOS en colaboración con el grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Alcalá que dirige BUJAN, es la generación de tejidos humanos a partir de una fuente indiferenciada de células de estirpe diferente a la que se quiere obtener. De este modo, se han conseguido transdiferenciar con éxito las células madre del cordón umbilical (concretamente, las células de la gelatina de Wharton) hacia células endoteliales vasculares útiles para la generación de vasos sanguíneos en laboratorio. Igualmente, se han transdiferenciado las células madre mesenquimales del tejido adiposo humano hacia células óseas, cartilaginosas, adiposas y neuronales, las cuales se utilizaron para la fabricación de tejidos humanos tridimensionales con distintos tipos de biomateriales (ALAMINOS et al., 2010; NIETO-AGUILAR et al., 2010).

## **Células madre pluripotentes inducidas**

En este sentido, y con el objetivo de inducir una transdiferenciación que lleve a una *reprogramación celular*, se está trabajando en *las células madre pluripotentes inducidas* (normalmente abreviadas como iPS, por sus siglas en inglés). Esta reprogramación celular ha sido destacada por la revista *Science* como uno de los mayores hitos de los últimos años. Estas iPS son un tipo de célula madre con características pluripotenciales que derivan artificialmente de una célula que inicialmente no era pluripotencial, por lo general una célula somática adulta, y sobre la cual se induce la expresión de ciertos genes.

Las células madre pluripotenciales inducidas de ratón se obtuvieron por primera vez en la Universidad de Kyoto por TAKAHASHI y YAMANAKA en el 2006. Ellos demostraron la inducción de células embrionarias iPS de ratón a partir de fibroblasto adulto cuando se realizó la transfección de 14 genes seleccionados, sólo cuatro de ellos resultaron efectivos (Oct3/4, Sox2; c-Myc y Klf4) a las células donantes por medio de vectores virales y bajo condiciones de cultivo de células madre embrionarias. Estas células presentaban las características morfológicas y las propiedades de crecimiento de las células madre embrionarias y expresaban los marcadores genéticos celulares de las mismas SSEA3/4, Tra 1-60 y Tra 1-81. El trasplante subcutáneo de estas células iPS dentro del ratón dio lugar a tumores que contenían una variedad de tejidos derivados de las tres hojas germinativas. Siguiendo la inyección hacia blastocisto, las células iPS contribuían al desarrollo embrionario del ratón.

Al año siguiente, dichos autores (TAKAHASHI et al., 2007) consiguen obtener células iPS a partir de células fibroblásticas humanas de la dermis facial de una mujer de 36 años, utilizando la misma metodología, esto es, la introducción de los cuatro factores Oct3/4, Sox2; c-MYc y Klf4 contenidos en el retrovirus Sic7a1 dentro del fibroblasto. Por otra parte, YU et al., 2007, demuestra que los factores para reprogramación necesarios para inducir iPS a partir de célula somática humana son (Oct-4, Nanog, Sox2 y LIN28), a través de la fusión celular. Ambos grupos opinan, no obstante, que para futuras terapias en humanos la bioseguridad del coctel genético y del vector –retrovirus o lentovirus- tendría que estar garantizada

En nuestro país, AASEN et al., (2008) perteneciente al grupo de IZPISÚA, han descrito la generación de células iPS a partir de queratinocitos humanos. La transducción retroviral con Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (el cóctel de YAMANAKA) de células primarias, adultas, procedentes incluso de un único pelo humano, resultó, al menos, 100 veces más eficaz y el doble de rápida que la llevada a cabo con los fibroblastos.

Estos logros, han sido considerados uno de los avances más importantes de la investigación con células madre, porque permite a los investigadores obtener células madres pluripotenciales. Esta metodología puede ser considerada en el futuro, según nos resaltan POZZOBON et. al., (2010) como una alternativa a la técnica de transferencia nuclear de células somáticas para obtener células madre. Y por tanto, podrían ser utilizadas en posibles aplicaciones en investigación y usos terapéuticos sin la controversia del uso de embriones. Sin embargo, el potencial tumorigénico permanece sin aclarar.

La mejora de este sistema de reprogramación para obtener células iPS ha sido puesta de manifiesto por el grupo de SOLDNER, et al. (2009). Aunque se requieren todavía mayores estudios valorativos antes de que ellas puedan ser usadas con rutina en Ensayos Farmacológicos y en la Terapia Celular en la Medicina Regenerativa.

Sobre los que piensen que las células iPS están libres de “pecado” moral, debemos recordar, de acuerdo con LÓPEZ GUERRERO (2009), que deberán analizar los resultados de obtenidos por CHUNG et al., (2009) de la compañía Advanced Cell Technology sobre la clonación de ratones a través de la colonización de un preembrión murino por células reprogramadas. ¿Entonces?

## **Quinta etapa: La célula se hace medicamento.**

### ***Manantial de nueva vida en donde nunca bebí*** **Antonio Machado**

Una vez que los trasplantes de órganos han alcanzado la mayoría de edad en el uso terapéutico, tanto desde el punto de vista técnico como el de los resultados. Se ha dirigido la atención hacia la utilización de células y tejidos con el mismo fin de poder sustituirlos cuando están dañados por otros procedente de un donante sano (ZAPATA, 2009). Esta utilización de células y tejidos, no es más que la transferencia del conocimiento básico al clínico. Y este es un proceso que debe ser necesariamente lento, aunque firme. En palabras de IZPISÚA, director del Centro de Investigación en Medicina Regenerativa de Barcelona, “*estamos intentando correr antes de aprender a gatear*”.

No obstante, este correr rápido, se debe, como nos apunta LOPEZ GUERRERO (2009), a la presión social que demanda de forma inmediata terapias para nuestros seres queridos, y a las que irresponsablemente alientan esas presiones sociales. Esto podría llevarnos a la precipitación “mediática” de algunos resultados básicos, y a veces, al fraude. Buen ejemplo lo tenemos en HWANG (2005), un científico ambicioso de la Universidad Nacional de Seúl, que creó falsos clones humanos, y que no eran más que simples embriones sin manipular.

A pesar de esto, los avances en los últimos años en el campo de las células madre han sido enormes y se van incardinando hacia su posible uso terapéutico. En este sentido, la Administración Federal de los Estados Unidos de América del Medicamento definió las características que debe reunir este proceso de Terapia Celular Somática. Asimismo, el Parlamento Europeo y la Comisión Europea emitieron sendas Directivas 2004/23 y 2006/17 por las que deben regirse dichas terapias. En ambos se considera a dicha Terapia Celular Somática como medicamentos, siempre y cuando para su obtención sea necesaria una manipulación experimental sustancial –para diferenciarlo del trasplante de tejidos u órganos-, incluidos dentro del tipo de productos de terapia avanzada.

Si un medicamento, es definido, por la Real Academia de la Lengua, como cualquier sustancia que, administrada interior o exteriormente a un organismo, sirve para prevenir, curar o aliviar la enfermedad y corregir o reparar las secuelas de esta. Hoy en día las células madre cumplen la posibilidad de curar algunas enfermedades y dolencias. Actualmente existen diferentes tratamientos en humanos, además del trasplante de médula ósea o

el de piel artificial sobre grandes quemados, que dependen del potencial de las células madre como posteriormente comentaremos. Por tanto, ellas, como medicamento, constituyen ese manantial machadiano que puede curar.

El hecho de que las células madre embrionarias produzcan, infecciones, defectos genéticos, tumores, así como, que están limitadas por problemas de rechazo y plantea problemas éticos. Por estas causas, hasta el momento, solamente se han iniciado estudios clínicos con células madre adultas.

Desde un punto de vista terapéutico, las células mesenquimales de la médula ósea han sido las más estudiadas en diversas enfermedades, ya sea en la reparación de distintos tejidos dañados (BARRY y MURPHY, 2004) o en la terapia génica (Van DAMME et al., 2002); e incluso, en la práctica clínica se utilizan como tratamiento de algunas enfermedades hematológicas y oncológicas, como la anemia aplásica ( HOROWITZ, 2000; FOUILLARD et al., 2003), y el linfoma maligno (APPELBAUM et al., 1978). Sin embargo, desde un punto de vista práctico, estas células presentan dos inconvenientes fundamentales: 1) El método de obtención es invasivo y doloroso para el donante, 2) Su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación decrece con la edad (RAO y MATTON, 2001; RANDO, 2006). Por esos motivos, es necesario estudiar otras fuentes de células mesenquimales que no tengan esas desventajas, como son las células madre del cordón umbilical, las células fetales del líquido amniótico y las iPS creadas en el laboratorio.

Las células que se utilizan para la terapia celular somática pueden proceder de otras personas (implantes *heterólogos*) y generan numerosos problemas, a parte de la escasez de donantes como la inmunosupresión, la infección vírica, el rechazo. Estas complicaciones desaparecerían si pudiésemos contar con tejidos procedentes del propio paciente (*autólogos*) o de un gemelo univitelino (*singénico*).

Estas células, una vez obtenidas de los pacientes serán manipuladas y cultivadas antes de ser administrada al paciente.

Vamos a comentar a modo de ejemplos algunas terapias en las que se está trabajando actualmente. En el tratamiento de la diabetes (trasplante de islotes pancreáticos), en traumatología (lesiones óseas y articulares), en enfermedades neurológicas (trasplante de neuronas dopaminérgicas fetales en la enfermedad de Parkinson), en enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio y isquemia crónica crítica de miembros inferiores), en lesiones corneales (trasplante de limbo), o en enfermedades dermatológicas (trasplante de piel artificial en los grandes quemados).

### ***Terapia Celular en Endocrinología***

En pacientes *diabéticos tipo I*, el autotrasplante de islotes pancreáticos humanos como tratamiento tampoco ha sido muy efectivo, debido al escaso número de células beta que se obtienen. Por ello, muchos laboratorios y grupos de investigación han intentado nuevas estrategias para expandir las masas de células beta tanto *ex vivo* como *in vivo*.

Aunque hasta el momento no ha sido posible caracterizar la célula madre pancreática, distintos estudios sugieren obtenerlas a partir de hígado, conductos pancreáticos o islotes pancreáticos, o incluso de médula ósea para producir células secretoras de insulina (HESS et al., 2003). En cualquier caso, sigue persistiendo que el porcentaje de células secretoras de insulina que se pueden obtener es muy pequeño, lo cual limita su aplicación terapéutica.

Existe el consenso de que el paso fundamental en las utilización de células madre embrionarias para convertirse en células beta es la diferenciación definitiva a endodermo. La conversión de este endodermo primitivo hacia células beta maduras resulta ser muy complejo y difícil de realizar por el momento.

El ensayo clínico en 23 pacientes diabéticos tipo I (fases 1 y 2) efectuado por COURI et al., (2009), desde noviembre de 2003 hasta Abril de 2008 en las Universidades de Sao Paulo (Brasil) y Northwestern (EEUU), utilizando un autotrasplante por infusión intravenosa de células madre hematopoyéticas periféricas. Ha creado en el mundo de la endocrinología unas expectativas enormes. Aunque, los resultados obtenidos son esperanzadores, sin embargo, no todos los pacientes tuvieron que prescindir de la insulina.

### ***Terapia Celular en Traumatología***

El organismo tiene una importante capacidad para reconstruir *los huesos, cartílagos y tendones* dañados, gracias a la capacidad regenerativa de las células progenitoras presentes en las estructuras lesionadas. Por ahora estamos lejos de conocer el origen y características fenotípicas de estas células progenitoras y los factores que gobiernan la formación y remodelación de los huesos. A pesar de este desconocimiento, se ha podido utilizar células maduras, como lo realizaron el grupo de BRITTBERG et al., (1994), como forma de contribuir a la regeneración de tejidos óseos y cartilagosos, y concretamente la utilización de células de cartílago cultivadas es un ejemplo de cómo el autotrasplante de células maduras puede ser un tratamiento eficaz para la reparación de la superficie articular.

Más atractiva resulta la posibilidad de utilizar células madre con capacidad de diferenciarse hacia tejidos de estirpe mesenquimal como el hueso o el cartílago. Las células madre mesenquimales pueden obtenerse a partir de médula ósea, pero también de grasa e incluso de otros tejidos. Y recientemente desde los trabajos De BARI et al., (2006) del King's College de Londres en el que se establecieron las características multipotenciales de las células madre mesenquimales del periostio, con capacidad de regenerar cartílago, músculo y huesos en pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias y degenerativas. Estas células periósticas constituyen una estrategia nada despreciable.

Estas cualidades han permitido su utilización para la reparación de lesiones óseas extensas normalmente utilizando algún tipo de soporte en la colocación de las células. Igualmente se han utilizado para tratar defectos

cartilagosos y lesiones traumáticas, de forma que pueden sustituir a los injertos de condrocitos, con la ventaja de sumar la capacidad proliferativa y de supervivencia al no tratarse de células maduras sino de progenitoras.

NAKAMURA et al., han realizado en 2009, una revisión sistemática de las distintas estrategias realizadas en Terapia Celular hasta el momento, con el fin de determinar cual de ellas era la más efectiva para tratar el cartílago articular lesionado. De este estudio, ellos concluyeron que todavía la Terapia Celular no constituye una técnica superior a otras utilizadas como estrategias terapéuticas en lesiones del cartílago articular.

La Agencia Europea del Medicamento a propuesta del Comité de Medicamentos de Uso Humano ha evaluado el medicamento "*ChondroCelect*". Posteriormente, la Comisión Europea emitió la autorización pertinente de comercialización válida para toda Europa para este medicamento a TiGenix NV el 5 de Octubre de 2009. Este medicamento de terapia avanzada es elaborado para cada paciente y consiste en una suspensión de condrocitos autólogos, viables y caracterizados, expandidos *ex vivo*, que expresan unas determinadas proteínas marcadoras específicas. Una vez construido, se implantará en lesiones del cartílago del cóndilo femoral de la rodilla en los adultos con el fin de reparar dichas lesiones.

Nuestro grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad se ha centrado especialmente en la evaluación de la viabilidad celular de diversos tipos de condrocitos aislados y cultivados en laboratorio a partir de pequeñas biopsias de cartílago humano y de animal. Concretamente, ha logrado evaluar la viabilidad celular de distintos subcultivos de cartílago fibroso de la articulación temporomandibular y de cartílago hialino de la articulación femoro-tibial (MONTALVO et al., 2008b).

### ***Terapia Celular en Enfermedades Neurológicas***

Según Naciones Unidas, la esperanza de vida de la especie humana en el año 2035 se incrementará notablemente, la población mundial mayor de 65 años habrá aumentado en un 135%. Como consecuencia de este envejecimiento, De PABLO (2009) nos indica que las enfermedades neurodegenerativas sufrirán un aumento notable. Esta situación hace que las investigaciones de posibles recursos terapéuticos basados en células directamente reparadoras del sistema nervioso, o indirectamente estimulantes de su regeneración, hayan experimentado un impulso espectacular en los últimos años.

Al tener el Sistema Nervioso Central menor potencial regenerador que otros tejidos, la terapia reparadora de disfunción celular por lesión, isquemia o degeneración, tiene que incluir un doble abordaje: terapia sustitutiva con precursores neurales y terapia antidegenerativa o neurotrópica.

Las células madre tienen un enorme potencial como células capaces de reconstruir las neuronas y estructuras dañadas en las enfermedades como el

Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la Esclerosis en Placas, los Infartos Cerebrales o las Lesiones Medulares, por mencionar algunas.

En la *enfermedad de Parkinson*, es quizá la que podría beneficiarse antes de la Terapia Celular. Esta terapia tiene por objetivo la implantación en el cuerpo estriado del paciente de células con capacidad para sintetizar y liberar dopamina. Así se han utilizado, según LUQUIN y MOYA (2005), las células cromafines de la médula suprarrenal, células dopaminérgicas fetales, células mesencefálicas fetales, células dopaminérgicas PC12 encapsuladas en polímeros de membranas derivadas de feocromocitoma, en ensayos clínicos en humanos con resultados cuanto menos controvertidos (RAMÓN-CUETO, et al., 2000).

ARJONA et al., (2003) han utilizado agregados del cuerpo carotídeo que fueron depositados bilateralmente a nivel del núcleo putamen a través de estereotaxia en pacientes de Parkinson. Los resultados obtenidos nos muestran que existe sólo una mejoría modesta de los síntomas clínicos y no en todos los pacientes.

El objetivo actual, según ZHAO et al., (2008) es generar células madre neurales y precursoras que puedan crecer en grandes cantidades y diferenciarse a neuronas dopaminérgicas que funcionen tras el trasplante.

El grupo de KIM et al, (2002) generó ya neuronas dopaminérgicas a partir de células madre embrionarias. Se han demostrado que las células madre adultas (células madre de médula ósea, células madre neurales) también son capaces de diferenciarse a neuronas dopaminérgicas. Asimismo, del cuerpo carotídeo se han aislado, también precursores (en este caso, parte del sistema nervioso periférico) por PARDAL et al (2007) con capacidad de producir dopamina. Sin embargo, no está claro hasta que punto dichas células son capaces de restablecer los circuitos neuronales destruidos en la enfermedad y por tanto eliminar los síntomas de la enfermedad. Últimamente, se acaba de demostrar, con respecto a la reprogramación a células iPS, que el grupo de SOLDNER et al., (2009) han logrado transformar células de la piel de pacientes con Parkinson en neuronas productoras de dopamina, habiendo sido capaces de escindir los lentivirus que usaron para introducir los cuatro genes reprogramadores.

En las *Lesiones Medulares*, principalmente secundarias a traumatismos, la posibilidad de utilizar células madres para restablecer las conexiones axonales aparece como una estrategia especialmente atractiva. Estudios recientes sugieren que las células madre embrionarias poseen capacidad de diferenciarse a neuronas motoras en animales con lesiones espinales (KERR et al., 2003). Otros tipos celulares, como las células de la glia envolvente o las células mesenquimales (o estromales) de la médula ósea, también han demostrado su capacidad para favorecer el crecimiento de los axones, tal como se ha demostrado en modelos animales (RAMÓN-CUETO, et al., 2000).

La *Esclerosis Múltiple* es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración de las células productoras de mielina

(oligodendrocitos) y que se manifiesta por una afectación tanto motora como sensitiva consecuencia de la desmielinización de los axones. Recientemente se ha podido demostrar en un modelo de esclerosis múltiple en ratón (encefalitis autoinmune experimental) que la inyección de neuroesferas (células madre neurales), tanto por vía intravenosa como intratecal, promueve la remielinización multifocal. Indudablemente, estos resultados están lejos de justificar la aplicación en pacientes en una enfermedad que, aunque incapacitante, tiene una supervivencia prolongada (PLUCHINO et al., 2003).

Por la gran incidencia y el elevado coste económico y humano que generan, los *Accidentes Cerebrovasculares* son uno de los objetivos más atractivos para la Terapia Celular. Los datos recientes que indican la presencia de un proceso de neurogénesis tras producirse una isquemia cerebral han estimulado el interés por utilizar células madres para suplementar la regeneración autogénica que se produce espontáneamente (ARVIDSSON et al., 2002). El trasplante de células madres neurales en modelos de rata ha demostrado ciertos beneficios, y de hecho se han realizado pequeños estudios en humanos utilizando neuronas obtenidas a partir de una línea celular de teratocarcinoma (NELSON et al., 2002).

Como hemos podido observar, el progreso en la biología de las células madre neurales ha sido muy importante en los últimos años. Pero, sin embargo, como nos lo indica De PABLO (2009), estamos muy lejos todavía de poder proponer una Terapia Celular, mediante implantación de células exógenas, en patología difusas como la *enfermedad de Alzheimer*.

### ***Terapia Celular en Enfermedades Cardiovasculares***

La utilización de células madre para regenerar el músculo cardíaco y los vasos sanguíneos ha abierto enormes esperanzas para un número muy importante de pacientes, siendo éste el campo en el que la experiencia clínica es mayor. Es, en la actualidad donde más ensayos clínicos se han publicado utilizando la Terapia Celular en pacientes para tratar *infartos de miocardio e isquemia periférica*.

El interés en la regeneración cardíaca y su aplicación clínica arrancó en 2001 cuando ORLIC et al., demostraron que *células progenitoras* Lin-negativas y *ckit*-positivas procedentes de *médula ósea*, eran capaces de reparar infartos agudos de miocardio en ratón, reponiendo “*de novo*” tanto el músculo como los vasos, y logrando una notable reparación funcional en, tan solo 9 días. No es de extrañar, como nos ha puesto de manifiesto SANCHEZ GARCIA y GARCÍA-SANCHO (2009), que los intentos de tratar el infarto agudo de miocardio en los pacientes con células progenitoras de médula ósea no se hiciesen esperar. Los resultados del primer ensayo clínico fueron publicados un año después, en 2002, por el grupo de STRAUER et al., y en la actualidad han sido tratados con esta terapia más de mil pacientes. Los resultados obtenidos presentan, sin embargo, una eficacia modesta, existiendo diferencias con los obtenidos en roedores.

Para estos ensayos se han utilizado diferentes fuentes. HERREROS et al., (2003) proponen el implante con *mioblastos autogénicos* en combinación con la cirugía de bypass aortocoronario o percutánea endocavitaria. Sin embargo, no se ha podido demostrar que las células originadas a partir de los mioblastos sean capaces de transmitir las señales electromecánicas de las células musculares cardíacas o de transdiferenciarse a células musculares cardíacas.

También se han utilizado *células madre derivadas de la médula ósea* (células madre endoteliales, células madre hematopoyéticas, o células progenitoras circulantes sin seleccionar) (STAUER et al, 2002; FERNÁNDEZ-AVILES et al., 2004; MEYER et al., 2006). Para ello, se han utilizado las vías percutánea, intracavitaria o intramiocárdica, para la implantación de células mononucleadas de médula ósea, células enriquecidas en progenitores hematopoyéticos o endoteliales y los resultados obtenidos se han monitorizado mediante técnicas de imagen y función como resonancia magnética, ecocardiografía o tomografía por emisión de positrones. En su conjunto, los resultados son positivos, con demostración de que el tratamiento con célula es capaz, tanto en modelos agudos como crónicos, de mejorar la función cardíaca y de contribuir a la mejora funcional de los pacientes. En el momento actual se desconoce los mecanismos por los que las células contribuyen a mejorar la función cardíaca.

La reciente identificación, caracterización y clonación de *células madre residentes cardíacas* abren nuevas esperanzas y expectativas. URBANEK et al, (2006) las describe localizadas en nichos específicos diseminados en el espesor de la pared cardíaca. Dichas células son multipotenciales, capaces de originar progenitores cardíacos comprometidos con cada uno de los linajes cardíacos (cardiomiocitos, células del músculo liso y células endoteliales). Los fármacos capaces de despertar a células madre residentes, y de movilizarlas para formar tejido contráctil *in situ*, o la expansión celular *in vitro*, seguida de la inyección en el área dañada, son dos de los objetivos más obvios, de estas células, que fueron descritos por TORELLA et al., (2005) y ANVERSA et al., (2006).

### **Terapia Celular en Oftalmología**

En condiciones fisiológicas, las células madre del limbo corneal son capaces de suplir la necesidad de renovación de la córnea. Sin embargo, en algunas situaciones patológicas como traumatismos, quemaduras, lesiones por sustancias químicas, síndrome de Stevens Johnson o penfigoide popular, la capacidad de regeneración de las células limbocorneales se ve desbordada (o se produce una disminución o ausencia de éstas) y se origina un daño corneal permanente. Aunque el trasplante de córnea es una opción, no es eficaz en los casos que es necesario restaurar el epitelio corneal. KENYON y TSEN, en 1989, fueron los primeros en llevar a cabo un autotrasplante de limbo conjuntival.

Actualmente el trasplante de estas células es una práctica reconocida y se usan células del ojo contralateral cuando el daño es en un solo ojo y células

de un donante cuando el daño es bilateral. Se pueden usar células histocompatibles de un donante vivo, o células no compatibles de donante cadáver. La posibilidad de expandir *ex vivo* estas células puede reducir el riesgo de deficiencia de células del limbo del ojo sano o del donante. La combinación de células del limbo con membrana amniótica se utiliza con éxito para promover una rápida reepitelización de la córnea. Es importante conocer la duración de estos trasplantes celulares en el caso de donantes alogénicos, ya que aunque en algunos casos se ha descrito la permanencia prolongada de células epiteliales del donante, otros estudios indican que la viabilidad de las células del donante no se mantiene indefinidamente.

Nuestro grupo de investigación logró elaborar uno de los primeros modelos de córnea artificial que incluía las tres capas principales que constituyen la córnea (epitelio, estroma y endotelio), utilizando para ello células de conejo de laboratorio (ALAMINOS et al., 2006). Es de destacar que éste es probablemente el único modelo completo en el que se utilizaron células normales procedentes de cultivos celulares primarios, y no células tumorales o inmortalizadas. En los últimos años, este grupo generó un modelo parcial de la córnea humana constituido por las dos capas más externas de la córnea humana (epitelio y estroma) utilizando cultivos celulares primarios de células normales. (ALAMINOS et al., 2008; GONZÁLEZ-ANDRADES et al. 2009a y 2009b CARRERAS et al., 2009). Este modelo demostró adecuados niveles de maduración epitelial, encontrándose en estos momentos en proceso de elaboración de un ensayo clínico específico para su evaluación clínica mediante queratoplastia lamelar anterior en un grupo de pacientes.

### ***Terapia Celular en Dermatología***

La posibilidad técnica de cultivar con éxito células epidérmicas autólogas bajo condiciones de cultivo controladas, ha permitido según HORCH et al., (2005) grandes avances en el campo de la reparación de las heridas. En este sentido, el grupo de MEANA (1998) ha desarrollado en el Banco de Tejidos y Cultivos Celulares del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, la construcción de *piel artificial* a partir de una mínima biopsia de piel. A partir de aquí, ellos realizan cultivos de las células madre epidérmicas según el modelo establecido por GREEN et al., (2003) para obtener los queratinocitos y como dermis artificial utilizando una metodología basada en plasma humano. Dicha piel artificial se construyen en tres semanas en láminas para usar terapéuticamente en grandes quemados y pacientes con úlcera cutánea. A veces, este tiempo necesario para la construcción de piel artificial es demasiado largo para la supervivencia del paciente, por ello, recientemente, GUENOU et al., 2009, han desarrollado un método alternativo basado en células madre embrionarias para la construcción de piel artificial.

Nuestro grupo de investigación, pudo generar piel humana artificial utilizando biomateriales biocompatibles y cultivos celulares obtenidos a partir de muestras de piel humana normal. Estos tejidos se evaluaron tanto *ex vivo* como *in vivo*, demostrando adecuados niveles de diferenciación tanto a nivel del epitelio como en la dermis artificial una vez implantados en un modelo animal inmunodeficiente (JIMÉNEZ, 2009).

En nuestra *comunidad autónoma*, en la actualidad existen al menos 12 ensayos clínicos de terapia avanzada en distintas fases de ejecución. Por tanto, este mito celular, en nuestro entorno empieza a ser realidad. Las terapias que se están desarrollando en fase II, esto es en seguimiento, están dirigidas, fundamentalmente hacia el campo cardiovascular y neurológico.

En el área cardiovascular, se está ensayando con la implantación intracoronaria de células madre autólogas de médula ósea, en pacientes con infarto agudo de miocardio anterior; con infarto crónico anterior y depresión severa de la función ventricular, y en pacientes infartados con cardiomiopatía dilatada.

Asimismo, dentro del área vascular periférica se está ensayando con la utilización tanto de células mononucleadas de médula ósea autóloga y células troncales mesenquimales autólogas de tejido adiposo en el síndrome de isquemia crónica crítica de miembros inferiores en pacientes diabéticos y no diabéticos.

En el terreno de la neurología, se está ensayando para evaluar la seguridad y factibilidad con dos dosis distintas de células troncales mesenquimales autólogas de tejido adiposo en pacientes con esclerosis múltiple secundariamente progresiva, que no responden adecuadamente a los tratamientos registrados. Asimismo, en pacientes con ictus isquémico agudo se está evaluando con la terapia de células mononucleadas autólogas de médula ósea la regeneración celular de los mismos.

Finalmente, se están ensayando en nuestra comunidad, en la enfermedad de injerto contra huésped el uso de células madre mesenquimales alogénicas procedentes del tejido adiposo. Y se está iniciando, a nivel digestivo, la regeneración hepática utilizando la infusión intraportal de células mononucleadas obtenidas de médula ósea autóloga. Estos ensayos clínicos constituyen nuestra realidad.

## **Sexta etapa: la célula y los fármacos se hermanan.**

***Todo era azul delante de aquellos ojos  
Miguel Hernández***

La manipulación de estas células para obtener un efecto terapéutico está regulada por el Reglamento Europeo 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de Noviembre e 2007 en el anexo I parte IV y el Real Decreto 1345/2007 de registro. Y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios deben asegurarse de que se cumplen las normas de calidad, seguridad, trazabilidad y farmacovigilancia. Por ello, los ensayos y experimentos con estas células tienen que realizarse en las denominadas salas de producción celular, las GMPs (Good manufacturing practices) o salas blancas. Las cuales deben adaptarse al Real Decreto 1301 de 10 de noviembre de 2006, donde se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el

almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos para uso en humanos.

En el ámbito hospitalario granadino, la Consejería de Salud y la Iniciativa Andaluza de Terapias Avanzadas han establecido que en nuestra ciudad existan, por el momento, dos salas blancas. Una está ubicada en el Hospital Virgen de las Nieves, la cual ya está validada por la Agencia Española del Medicamento y la otra, aún pendiente de validar, está situada en el Centro Regional de Transfusiones Sanguíneas y Banco Sectorial de Tejidos, con el que está vinculada nuestro grupo de investigación y departamento. En ambas, por ahora, la Agencia permitirá la producción y envasado de medicamentos celulares.

Este aspecto de control y seguridad resulta ser de especial significación y por ello existen, en la actualidad, diferentes y variados métodos que se pueden realizar en el laboratorio para estudiar la viabilidad y funcionalidad celular durante su procesamiento y manipulación.

De entre todos, vamos a comentar algunos de ellos.

### **Evaluación de la integridad de la membrana**

Si una célula está muerta o se está muriendo, la función de la membrana celular se encontrará alterada. Para evaluar la integridad de la membrana podemos utilizar distintos métodos.

Con respecto a los ensayos de exclusión, que son lo más utilizados, consisten en utilizar colorantes orgánicos del tipo del *azul tripán* (HOSKINS et al., 1956; PHILLIPS, 1973; PATTERSON, 1979), o tintes con fluorescencia como el yoduro de propidio (BANK, 1987). Siendo el azul tripán el colorante más utilizado. Con este método de viabilidad, si la membrana plasmática está dañada, la célula se tiñe de púrpura-violeta, mientras que las células no dañadas aparecen translúcidas al microscopio.

Para los Ensayos de inclusión podemos utilizar *el diacetato de fluoresceína* (ROTMAN y PAPERMASTER, 1966; MOHR y TROUSNISON, 1980) o *la calceína* (PAPADOPOULOS et al., 1994). Utilizan un modelo opuesto a los anteriores y se ve por el microscopio de fluorescencia.

Los Métodos basados en la utilización de tinciones catiónicas nos evalúan los cambios existentes en el potencial de membrana mediante microfluorimetría. El método del *éster de rodamina* es un buen ejemplo de ellos (EHRENBERG et al., 1988).

Los Métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas en el medio extracelular, comprenden tres tipos de fundamentos de ensayos de liberación: de enzimas (la *lactato deshidrogenasa* (LDH) (LEGRAND et al., 1992) y los que detectan enzimas mitocondriales de ácidos nucleicos (ADN) (PARK et al., 2008) y del cromo radiactivo (Cr <sup>51</sup>) (RINALDI et al., 1998).

## **Ensayos funcionales**

Estos métodos de estudio de la viabilidad celular tratan de evaluar los componentes metabólicos que son necesarios para el crecimiento celular. A menudo se evalúa la energía celular midiendo los niveles totales de ATP y la tasa de ADN o síntesis de proteínas.

Estos niveles de ATP pueden medirse utilizando la técnica de ATP-bioluminiscencia (SEVIN et al., 1993) o la prueba de bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (BURTON, 2005; WANG et al, 2006).

La síntesis del nuevo ADN puede ser medida al incorporar timidina marcada radiactivamente y se introduce en el medio de cultivo, para que se incorpore al ADN durante la replicación. El nivel de proliferación se evalúa en función del nivel de radiactividad alcanzado por las células en cultivo. Con ello, estimamos el número de células que están proliferando (ALLISON y RIDOLPHO, 1980).

## **Ensayos con biosensores de fluorescencia**

Los biosensores de fluorescencia permiten mediar la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones en células vivas con una enorme resolución temporal y espacial. Los biosensores son proteínas marcadas con fluorescencia que miden reacciones químicas específicas, las cuales pueden ocurrir tanto dentro de la célula como en su superficie. Con este tipo de pruebas se puede conocer la viabilidad celular de manera rápida (GIULIANO y TAYLOR, 1998).

## **Ensayos morfológicos**

Los cambios morfológicos que ocurren en la superficie celular o en el citoesqueleto pueden estar relacionados con la viabilidad celular. Por ejemplo, los cambios de volumen irreversibles pueden ser utilizados para indicar la muerte celular. Si existe una gran disminución en el volumen celular, este puede ser secundario a la pérdida de proteínas o iones intracelulares, o debido a una alteración de la permeabilidad para el sodio o el potasio (ALLEN, 1988).

Pero estos cambios son más difíciles de medir, y como consecuencia, tienen menos utilidad que la evaluación de integridad de la membrana o los ensayos funcionales.

## **Microanálisis por energía dispersiva de rayos X**

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA) es una técnica que utilizando un haz de electrones permite estudiar y correlacionar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica. Además, permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones ( $Z < 11$ ) presentes en el espécimen irradiado por el haz de electrones y

requiere tan solo un número de células pequeño (WARLEY et al., 1994; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Son muy escasos los laboratorios que han desarrollado la metodología necesaria para evaluar la composición elemental de células. En nuestro departamento, se han desarrollado estas técnicas desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo en un principio para el estudio de los receptores del equilibrio y los tejidos duros (CRESPO et al., 1993; LOPEZ-ESCAMEZ et al., 1993; CAMPOS et al., 1994). Sin embargo, en los últimos años, en nuestro laboratorio hemos iniciado su aplicación al estudio de células completas en cultivo (FERNÁNDEZ SEGURA et al., 1999b; CRESPO et al., 2001; ARREBOLA et al., 2005; SANCHEZ-QUEVEDO, et al., 2006; ALAMINOS et al., 2007).

Cada célula analizada posee un determinado perfil iónico. En los espectros obtenidos del perfil iónico se pueden observar elementos como fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg), cloro (Cl), calcio (Ca), sodio (Na) y potasio (K). Algunos de los iones determinados por microanálisis juegan un papel en la viabilidad celular, de tal manera que cambios en la concentración de estos iones en una célula pueden correlacionarse con proceso de muerte celular por necrosis o apoptosis. (HONGPAISAN Y ROOMANS, 1999; ROOMANS, 1999 y 2002). En este contexto, algunos autores han identificado patrones iónicos que son enormemente específicos para las células normales, células en apoptosis y células en necrosis.

Comentaré las interpretaciones de estos iones desde un punto de vista microanalítico.

El fósforo es un elemento que se correlaciona con la masa celular analizada, la concentración de constituyentes orgánicos intracelulares, el contenido en ácidos nucleicos y el nivel de fosforilación celular. La concentración de este elemento permanece constante en células que no muestran un daño estructural. Por el contrario, las células con un daño estructural grave se caracterizan por una disminución de la concentración intracelular de fósforo (ROOMANS, 2002b)

Los valores de azufre constituyen un indicador microanalítico del contenido de proteínas sulfatadas, glicosaminoglucanos y proteoglicanos a nivel celular (SÁNCHEZ-QUEVEDO et al., 1989; ROOMANS 2002).

Otro de los elementos analizados es el magnesio. El magnesio es un catión divalente que interviene en un número muy amplio de reacciones intracelulares, como reacciones de fosforilación y replicación del ADN. Estudios previos han demostrado que un descenso en la concentración elemental de magnesio se correlaciona con un descenso en la concentración de ATP celular, que es la fuente de energía de las células (BUJA et al., 1985; Di FRANCESCO et al., 1998).

Por otra parte, el descenso de cloro es un indicador precoz de apoptosis que suele coincidir con la disminución de potasio y el aumento de sodio

(SKEPPER et al., 1999; SALIDO et al., 2004; ALAMINOS et al., 2007). Por ello, la determinación microanalítica de cloro es fundamental en cualquier cultivo celular a la hora de evaluar la viabilidad de las células que forman parte del mismo.

En relación con los niveles intracelulares de calcio, es sabido que estos incrementan significativamente en algunos tipos de muerte celular (JOHNSON y DECKWERTH, 1993).

Finalmente, ROOMANS y otros autores (ROOMANS, 2002; FERNANDEZ-SEGURA Y WARLEY, 2008) establecieron que microanalíticamente las concentraciones de sodio y potasio constituyen uno de los indicadores más sensibles y fiables de viabilidad celular. Además, ROOMANS sugiere que la razón o cociente K/Na constituye un excelente indicador del daño celular, desde un punto de vista microanalítico.

### **Determinación del perfil de expresión génica mediante microarrays**

El microarray o micromatriz multigénica es una técnica que permite la evaluación simultánea de un gran número de genes o incluso de un genoma completo en un único experimento (FRIEMENT et al., 1998). Recientemente, esta técnica se ha convertido en una herramienta para estudiar algunas propiedades específicas de las células susceptibles de ser utilizadas en Terapia Celular y en Ingeniería Tisular (GILL, 2003; JALURIA et al., 2007 y 2008). Por ejemplo, una de las propiedades celulares que se puede evaluar con el microarray podría ser la viabilidad celular mediante la identificación de genes relacionados con la mortalidad celular (por ejemplo, genes de apoptosis y anti-apoptosis) (WONG et al., 2006) y de esta manera, se podría realizar una selección de las células, escogiendo las que tienen un mayor grado de viabilidad.

Atendiendo a su función, podemos distinguir tres tipos fundamentales de microarrays: de expresión génica, de ADN y de proteínas.

El Microarrays de expresión génica (BOWTELL, 1999) es una técnica que se basa en la detección de ARN mensajeros específicos que están presentes en una muestra biológica en un momento dado. Por lo general, este tipo de microarrays son los más utilizados y los más conocidos.

Un tipo especial de Microarrays de ADN es aquél en el que se evalúa la presencia de modificaciones epigenéticas tipo metilación a nivel del promotor de ciertos genes (ZILBERMAN y HENIKOFF, 2007).

Los Microarrays de proteínas (TAO et al., 2007), consisten en un chip en el que se coloca cierto número de anticuerpos específicos de origen conocido, frente al cual se hibrida un extracto proteico previamente marcado.

### **Séptima etapa: la célula humana ¿podrá ser suplantada?**

***No rechaces los sueños por ser sueños.***

***Todos los sueños pueden ser realidad***  
***Pedro Salinas***

Durante esta exposición, he intentado equiparar a la célula con el medicamento, pero...¿Sería posible sintetizarla y crearla en el laboratorio? Actualmente es un sueño, y como aconseja SALINAS no debemos rechazarlo porque puede que algún día, no muy lejano, llegue a ser realidad. Este sueño de creación de célula artificial humana, constituye, hoy en día según RIFKIN (1999), uno de los “boom biotecnológico” de esta década.

Como hemos comentado en el planteamiento del discurso, la creación de vida artificial se inició con el descubrimiento de la estructura molecular del ADN que nos permitía entender la replicación celular. Y se concluyó, desde esta perspectiva, cuando un 26 de junio de 2000, el presidente CLINTON anunció la obtención del primer borrador del Proyecto genoma Humano público y el “primer ensamblaje” obtenido por Celera. El primer ministro británico lo calificó como el primer gran triunfo tecnológico del siglo XXI.

SOLE et al., (2007) consideran que la vida celular no puede ser descrita únicamente solo en términos de ADN. Al igual que SCHRÖDINGER (2008), consideraban que la vida era algo más que replicación, era metabolismo. DYSON, al igual que los autores anteriores, propuso en 1982 su atractiva teoría sobre el origen de la vida, en el que el metabolismo y la replicación constituyen las dos etapas iniciales.

Von NEUMANN (1951) aclaró las relaciones lógicas entre replicación y metabolismo. El autómata mecánico que él estableció presentaba dos componentes esenciales: el hardware y el software. El hardware es el que procesa la información; y el software el que lo incorpora. Estos dos componentes poseen sus análogos exactos en las células vivas; el hardware son las proteínas, y el software son los ácidos nucleicos. Por lo que, las proteínas son el componente esencial del metabolismo y los ácidos nucleicos de la replicación.

Lo realmente sorprendente es que, actualmente, el ARN en las células se puede comportar como los dos componentes. El ARN genómico como software. El ARN ribosómico y el ARN transferencia como hardware. Y el ARM mensajero desde que CECH en 1993, describió las ribozimas, actúan de forma simultánea tanto hardware como software.

Para SMITH y MOROWITZ (2004), el metabolismo constituye un punto esencial para la genesis de la vida, ya que provee el medio de almacenamiento de energía necesaria, para la construcción y mantenimiento de los componentes celulares, que permite el crecimiento celular.

A la pregunta de REGIS (2009) *¿Qué es la vida?*, SOLÉ et al., (2007) nos recuerda que la vida desde el punto de vista celular tiene que ser descrita no solo de replicación y metabolismo, sino que además como compartimento (membrana celular). DYSON (1999) define a la célula, a este respecto, como un volumen confinado de fluido que contiene pequeñas moléculas orgánicas

(monómeros) en solución. Hoy sabemos, por POHORILLE et al., (2005) que la membrana de las células es un componente activo que permite el intercambio de nutrientes externos por medio de transportes especializados catalizados. Los monómeros serían versiones primitivas de los aminoácidos que polimerizan para formar las enzimas modernas.

Concluir que la vida celular emerge de la unión de estos tres componentes: replicación, metabolismo y de membranas.

Una vez establecidos los componentes que permiten el inicio de la vida. La *Biología Sintética*, está explorando métodos, teorías y perspectivas para la consecución de sistemas celulares artificiales simples. Esta nueva biología combina la ciencia y la ingeniería (diseño y construcción de sistemas biológicos) y fue portada el 24 de noviembre de 2005 de la revista *Nature*. Dicha biología nos permite la construcción de protocélulas, esto es, la construcción de un ensamblaje químico como vida, en forma de un sistema de célula artificial capaz de automantenerse, reproducirse y potencialmente evolucionar.

POHORILLE y NEW (2001) nos apuntan, que en la comunidad científica existe un consenso sobre el requerimiento y propiedades que debe tener un sistema vivo mínimo. En este sentido, DREAMER (2005) estableció la hoja de ruta para la construcción de un sistema de vida artificial en un laboratorio, que va de lo simple a lo complejo.

Para la construcción de células artificiales resultaron sumamente útiles los trabajos de ALAN TURING que sobre inteligencia artificial realizó en 1950 al proponer un juego de imitación, el "*test de Turing*". Se pensó que si este concepto funcionaba para la inteligencia artificial, ¿por qué no podría algo análogo funcionar para las células artificiales?

En este sentido, el Centro Europeo para la Tecnología de lo Vivo (ECLT) instalado en Venecia, organizó en la isla de San Servolo un congreso con el fin de obtener un test de Turing para formar vidas artificiales. A él asistieron, KRASNOGOR, PACKARD, BEDAU, RASMUSSEN, DEAMER, HANCZYC. Se plantearon algunas ideas extremadamente imaginativas y algunas de ellas quedaron plasmadas en el trabajo que CRONIN et al., publicaron en 2006 en la revista *Nature Biotechnology*, titulado "*El juego de la imitación. Un enfoque químico computacional para el reconocimiento de vida*". Concluyendo los autores que se necesitaba mayor investigación para comprender mucho mejor como estas estructuras celulares químicas pueden imitar a los sistemas vivos.

Sin embargo, este trabajo marcó la dirección a seguir en la construcción de la protocélula artificial. Dicha dirección era la regulación genética del metabolismo, es decir el punto en el que los procesos metabólicos de una célula artificial serían controlados por una molécula de algún tipo capaz de manejar la información. Con este propósito, RASMUSSEN et al., (2003) inicia este camino en el Laboratorio Nacional de los Álamos, y logró que un gen artificial dirigiera una reacción química en la que realmente se construía algo.

En concreto, una molécula del tipo de los ácidos grasos que formaría parte del contenedor de la protocélula.

De nuevo surge la pregunta ¿Es actualmente posible sintetizar vida? Con lo sabido hasta ahora, parece que no. ¿Existe alguna esperanza? DREAMER (2005) cree que sí usando una técnica desarrollada para la selección y evolución molecular de ARN. Debido a que JOHNSTON et al., 2001, habían producido una *ribozima* que puede crecer al copiar una secuencia de bases de su propia estructura. Aunque la polimerización se ha realizado sólo para copiar una corta hilera de nucleótidos, esto es un buen comienzo, que nos hace ilusionarnos que la vida en un tubo de ensayo muy pronto será una realidad.

Recientemente, en este sentido, se han desarrollado modelos para la construcción de las células artificiales:

El primero de ellos, el denominado *Modelo de arriba-abajo*, de mayor a menor complejidad, el “*Top-down*” de LUISI et al., (2002) que incluye la creación de una célula mínima al reducir el genoma de una célula actual. Los genes que se han considerados mínimos y necesarios para sustentar una célula viva que se reproduce no está aún del todo aclarado. Para GABALDON et al., (2007) serían 206 y para MUSHEGIAN y KOONIN (1996), unos pocos más 256.

El segundo, el propuesto por RASMUSSEN et al., (2003), es el *Modelo de abajo-arriba*, o de menor a mayor complejidad denominado “*Bottom-up*”, aquí se empieza por la construcción de los componentes moleculares. Esto puede ser realizado por biología natural o completamente por ad hoc por componentes químicos. En ambos casos un compartimento es requerido, formado por algunos tipos de moléculas anfifílicas caracterizadas por su tendencia natural a agregarse para formar componentes celulares que se pueden unir y acoplar. Polímeros formados por lípidos anfifílicos que pueden formar vesículas.

Por otra parte, LUISI et al., (2006) sugiere un tercer *Modelo intermedio* entre los dos anteriores, el de “*Reconstrucción*”. Este se refiere a la encapsulación de ácidos nucleicos y enzimas en liposomas, definidas como una célula semiartificial, las cuales se autoreplican como se ha observado en trabajos experimentales y teóricos.

De este modo, McCASKILL et al., (2007) investigador del consorcio PACE, desarrolló y optimizó la “*protocélula complementada*”. Por otro lado, BEDAU y PACKARD (2003) y su equipo de Protolife, trabajan en el diseño de vesículas, con la posibilidad de añadir ácidos nucleicos como el APN o el ADN. Y finalmente, en la creación de células minimalistas. En este sentido, se fueron desarrollando nuevas protocélulas con nombres muy singulares: libre de información, que conducen la transducción, enzimas conductores, Turing, Chemoton, ribocelulas, células mímicas. Incluso, algunas de ellas se han explorado hasta desde el punto de vista matemático.

Simultáneamente a lo anterior, CRAIG VENTER (2008), estableció como poder sintetizar el genoma de la bacteria "*Mycoplasma genitalium*", esto es el paso más decisivo, que ha ocurrido actualmente, para la producción de vida artificial. De este modo creó a "*Sintia*", ensamblando trozos infinitesimales de ADN. Sintia era el primer ser vivo artificial que está a punto de entrar en escena. Sin embargo, antes de Sintia existieron diversos ensayos que no fueron tan populares: El "*represilador*" de ROSENFELD et al., (2005) o la "*refactorización del bacteriófago T7*" de CHAN et al., (2005).

Sintia, puede catalogarse como el tercer tipo de cyborg (genético, biotecnológico) y personifica la idea de construcción artificial de vida, de creación técnica de lo orgánico. Sin-tia por tanto, es un sin-toma, un indicador de lo que nos viene. SÁDABA (2009), nos recuerda que Sintia es la puerta abierta a un tipo de cyborgización que se conforma desde su materia prima, desde los cimientos milimétricos e invisibles que lo constituyen.

Tarde o temprano estaremos en condiciones de rediseñar la información de nuestras células e, incluso, moléculas, pudiendo quitar o poner genes, agregar mitocondrias, ribosomas, moléculas o segmentos de ADN al gusto; es decir, de transformar la materia a un nivel atómico, ya que los nanomundos son los cimientos de los nanocuerpos.

El papel que la Biología Sintética tiene que jugar en un futuro no es únicamente permitir restituir organismos o crear sistemas biológicos, como – plaquetas artificiales o glóbulos rojos a la carta- sino incluso poder inventar nuevas especies. Pero no debemos olvidar lo que dice LURIA (1975), que las células son sólo fábricas químicas y que es el hombre el único en conocer las alegrías y tormentos de la voluntad consciente.

## Epílogo

***Salto de aquí a otro tiempo.***  
**Antonio Fernández Montoya**

En uno de mis libros favoritos "*diarios indios*", de la escritora belga CHANTAL MAILLARD, la autora nos describe las sensaciones que experimentó al descender, a través de las cuarenta y ocho escalinatas y sumergirse en el río Varanasi. Allí presencié la vida, la muerte, la esperanza, los deseos, los símbolos, las señales, la existencia de un lenguaje divino, que hicieron que para ella el tiempo volviera a abrirse de nuevo.

Estas descripciones y vivencias han estado presentes en mi interior en la elaboración de este discurso, en la que he evocado a la célula y la he presentado como protagonista de nuestro arsenal terapéutico, debido a la denominación del sillón académico que voy a ocupar.

Según el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española "*mito*" es "*persona o cosa rodeada de extraordinaria estima*", eso es para mí la célula, algo por lo que, es obvio, siento estima. Pero también, nos dice el Diccionario que "*mito*" es "*una noticia que desfigura lo que realmente es, dándole*

*apariencia de ser más valiosa y atractiva*". Las últimas noticias sobre la célula han estado envueltas de falsas apariencias.

EMILIO PACHECO, reciente premio Cervantes, refiriéndose a la vida escribe *"Ahora está como nueva. Pero no es nueva"*. Esto es lo que actualmente le sucede a la célula, al ser considerada como medicamento. En este discurso, he intentado desvelar y retratar su nueva realidad. Una realidad, que a mi juicio, resulta estimulante y llena de posibilidades para la ciencia médica.

ÉMILE ZOLA reflexionaba, en París el 18 de Mayo de 1893, ante un grupo de estudiantes *¿La ciencia da felicidad?* Su respuesta parece coincidir con lo expuesto aquí esta noche. ZOLA continuo diciendo *"la ciencia nos da solo verdad"*. La cuestión es... *¿ sí sabremos ser felices con dicha verdad?*

Muchas gracias.  
He dicho.

## Bibliografía

- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induce pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26; 1276-1284. 2008.
- Alaminos M, González-Andrades M, Muñoz-Ávila JI, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Campos A. Volumetric and ionic regulation during the in vitro development of a corneal endothelial barrier. *Experimental Eye Research.* 2008; 86(5):758-69.
- Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, García-Honduvilla N, Romero B, Campos A, Buján J. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 2010; Feb 8. [Epub ahead of print]
- Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, García JM, Crespo PV, González-Andrades M, Campos A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol.* 2007; 211(3): 692–98.
- Alaminos M, Sánchez Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS).* 2006; 47: 3311-17.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell.* 5ª ed. Garland Science. New York. 2008.
- Allen JC. Sodium and potassium content and viability of mouse mammary gland tissue and acini. *J Dairy Sci.* 1988; 71(3): 633–642.
- Allison DC, Ridolpho P. Use of a trypan blue assay to measure the deoxyribonucleic acid content and radioactive labeling of viable cells. *J Histochem Cytochem.* 1980; 28(7): 700–703.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996; 87: 171.
- Alonso Bedate C. Células troncales embrionarias (ES). Derivación, propiedades y capacidades funcionales. En: *Investigación con células troncales.* Monografías Humanitas. Barcelona. 2004. pp 23-41.
- Anversa P, Kajstura J, Leri, A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigma shift in cardiac biology. *Circulation.* 2006; 113:1451-63.
- Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood.* 1978; 52(1): 85–95.
- Arjona V, Mínguez-Castellano A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, pardal R, Méndez-Ferrer S, Martín JM, Pérez M, Katiti Mj, Valencia E, García, López-Barneo J. Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson disease. *Neurosurgery.* 2003; 53:321-8.
- Arrebola F; Cañizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Warley A, Fernández-Segura E. Biphasic behavior of changes in elemental composition during staurosporine-induced apoptosis. *Apoptosis.* 2005; 10: 1317-31.
- Arrebola F, Fernández-Segura E, Campos A, Crespo PV, Skepper JN, Warley A. Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:638-49.
- Arrebola F, Zabiti S, Cañizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Fernández-Segura E. Changes in intracellular sodium, Chlorine, and Potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J Cell Physiol.* 2005b; 204: 500–07.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002; 8(9): 963-70.
- Asakura A, Seale P, Gargis- gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 2002; 159(1): 123-34.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science.* 1998; 281: 1305-08.
- Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 2007; 25(6): 1384–1392.
- Bank HL. Assesment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia.* 1987; 30(10): 812–816.

- Barros LF, Hermosilla T, Castro J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol* 2001; 130: 401-409.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(4): 568-584.
- Bedau MA, Packard NH. Evolution of evolvability via adaptation of mutation rates. *Biosystems*. 2003; 69(2-3): 143-62.
- Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. *The world of the cell*. 4<sup>a</sup> ed. Addison Wesley Longman Publishers. 2007
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114(6): 763-76.
- Brittberg M, Lindahl, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331:889-95.
- Bowtell DD. Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet*. 1999; 21(S1): 25-32.
- Bruch JF, Sibony O, Benali K, Challier JC, Blot P, Nessmann C. Computerized microscope morphometry of umbilical vessels from pregnancies with intrauterine growth retardation and abnormal umbilical artery Doppler. *Hum Pathol*. 1997; 28(10): 1139-1345.
- Buja LM, Hagler HK, Parsons D, Chien K, Reynolds RC, Willerson JT. Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Lab Invest*. 1985; 53(4): 397-411.
- Buja LM, Marsha L, Eigenbrodt MD; Edwin H, Eigenbrodt MD. Apoptosis and necrosis. *Arch Pthol Lab Med* 1993, 117:1208-1214.
- Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity. *Methods Mol Med*. 2005; 110: 69-78.
- Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology*. 2008; 134(3): 833-848.
- Campos A. Citología Molecular. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz*. 1975; 15: 1-86.
- Campos A. Histología Médica. *Medicina Clínica*. 1985; 85: 63-65.
- Campos A, Lopez Escamez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Baeyens JM. Gentamicin ototoxicity in otoconia. Quantitative electrón probe X-ray microanálisis. *Acta Otolaringol (Stockh)*. 1994; 114: 18-23.
- Carrascal E. *El microscopio y su aportación a la ciencia: un recorrido histórico*. Universidad de Salamanca. Salamanca. 2007.
- Carreras FJ, Porcel D, Alaminos M, Garzón I. Cell-Cell Adhesion in the Prelaminar Region of the Optic Nerve Head: A Possible Target for Ionic Stress. *Ophthalmic Research*. 2009; 42(2):106-11.
- Castedo M, Ferri K, Roomier T, Métivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alteration associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 2002; 265: 39-47.
- Cech, TR. The efficiency and versatility of catalytic RNA: Implications for an ARN world. *Gen*. 1993; 135: 33-36.
- Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Molecular Systems Biology* 2005; 13 Septiembre; doi:10.101038/msb4100025.
- Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. *Apoptosis*. 2002; 7:313-19.
- Chung, Y. Bishop CE, Treff NR, Walker SJ, Sandler VM, Becker S, Klimanskaya I, Wun WS, Dunn R, Hall RM, Su J, Lu SJ, Maserati, M, Choi YH, Scott R, Atala A, Dittman R, Lanza R. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. *Clonin Stem Cells*. 2009; 11: 1-11.
- Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: Two faces of eve. *Cell*. 2006; 124: 1111-15.
- Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006; 18(6): 1089-1096.
- Cooper GM, Hausman RE. *La célula*. Marban. Madrid. 2010.
- Cotran RS; Kumar V, Collins T. Patología celular I: lesión y muerte celulares. En: Cotran RS; Kumar V, Collins T (ed) *Patología estructural y funcional*. Edición, McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 2000; pp.1-31.

Couri C, Oliveira M, Stracieri A, Moraes D, Pieroni F, Barros G., Madeira MI, Malmegrim K, Foss-Freitas M, Simoes B, Martinez E, Foss M, Burt R, Voltarelli J. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 Diabetes Mellitus. *JAMA*, 2009; 301: 1573-79.

Craig Venter J. *La vida descodificada*. Espasa. Madrid. 2008.

Crespo PV, Lopez-Escamez JA, Cañizares FJ, Campos A. X-ray microanalytical determination of P, S and K concentrations in the gelatinous membrane of the utricle. *Acta Otolaryngol.* 1993; 113(2): 176–180.

Crespo PV, Arrebola A, Zabiti S, Cañiáres FJ, Cubero MA, Warley A. Fernández-Segura E, Campos A. Preparation of cultured cells for study of intracellular element concentrations by x-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *Scanning.* 2001; 23(2): 138-9.

Cronin L, Krasnogor N, Davis BG, Alexander C, Robertson N, Steinke JHG, Schroeder SLM, Khlobystov AN, Cooper G, Gardner PM, Diepmann P, Whitaker BJ, Marsh D. The imitation game –a computational chemical approach to recognizing life. *Nat Biotechnol.* 2006; 24(10): 1203-06.

Czyz J, Wobus A. Embryonic stem cells differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation.* 2001;68 (4-5) : 167-74.

De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe, Eyckmans J, Khan IM, Archer ChW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage Analysis. *Arthritis & Rheumatism.* 2006; 54(4); 1209-21.

De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(1): 100-06.

De Duve Ch. *La célula viva*. Labor. Barcelona. 1988.

De Duve Ch. *La vida en evolución. Moléculas, mente y significado*, Barcelona, Crítica, 2004.

De Pablo F. Células madre neurales, neurogenesis y neuroprotección. En: *Células Madre y Terapia Regenerativa*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2009. pp. 101-30.

De Robertis E, Nowinski WW, Sáez FA. *Citología General*. El Ateneo. Buenos Aires. 1946.

Di Francesco; Desnoyer RW, Covacci V, Wolf FI, Romani A, Cittadini A, Bond M. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 360(2): 149–157.

Diez J. Apoptosis en las enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol.* 2000; 53:267-274.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97 (6): 703-16.

Dreamer D. A giant step toward artificial life? *Trends Biotech.* 2005; 23: 336-38.

Dyson FJ. A model for the origin of life. *J. Mol Evol.* 1982; 18: 244-350.

Dyson FJ. *Los orígenes de la vida*. Madrid. Cambridge University Press. 1999.

Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 3:337-43.

Ed Regis. *¿Qué es la vida?*. Espasa Madrid. 2009.

Eguchi G, Kodama R. Transdifferentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5(6): 1023-8.

Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J.* 1988; 53(5): 785–794.

Elgjo RF, Henriksen T, Evensen SA. Ultrastructural identification of umbilical cord vein endothelium in situ and in culture. *Cell Tissue Res.* 1975; 162(1): 49–59.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819): 154–156.

Fernández- Aviles F, San Román JA; García- Frade J, Fernández ME, Penarrubia MJ, de la FL Gómez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernández J, Gutiérrez O, Sánchez P L Hernández C, Sanz R, García- Sancho J, Sánchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells alter myocardial infarction. *Cir Res.* 2004; 95: 742-48.

- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studies by electron probe X-ray microanalysis. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253(2): 454-62.
- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Campos A, Warley A. A procedure to preapre cultured cells in suspensión for electron probe X-ray microanalysis application to scanning and transmission electron microscope. *J. Microsc.* 1999b; 196: 19-25.
- Fernandez-Segura E, Warley A. Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell Biol.* 2008; 88: 19-43.
- Ferrer D. *Esquemas de Histología*. 4ª ed. Espaxs. Barcelona. 1975.
- Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia*. 2003; 17(2): 474-476.
- Friemert C, Erfle V, Strauss G. Preparation of radiolabeled cDNA probes with high specific activity for rapid screening of gene expression. *Methods Mol. Cell Biol.* 1998; 1: 143-153.
- Frost JK. *The Cell in Health and Disease*. 2ª ed. Karger. Basilea. 1986.
- Gabalón T, Peretó J, Montero F, Gil R, Latorre A, Moya A. Structural analices of a hypothetical minimal metabolism. *Phil Trans R Soc B*. 2007; 362: 1751-62.
- Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggen K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*. 2004; 427(6970): 148-154.
- Gill RT. Enabling inverse metabolic engineering through genomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2003; 14(5): 484-490.
- Giuliano KA, Taylor DL. Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 1998; 16(3): 135-140.
- Gómez Sánchez J. *Luis Urtubey: Un maestro olvidado*. Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz. 1980.
- González Santander R, González- Santander Martínez M, Martínez Cuadrado G. *La Microscopia Electrónica Española en la Investigación Científica 1946-1999. (Sociedad Española de Microscopia Electrónica 1956-1999)*. Universidad de Alcalá. Alcalá. 1999.
- González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Ávila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009a; 3(6):442-49.
- González-Andrades M, Garzón I, Bellido R, Muñoz-Ávila JI. Aislamiento de células epiteliales corneales a partir del limbo esclerocorneal humano. *Actualidad Médica*. 2009b; 94(777):8-13.
- Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the developmental of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(26): 15625-30.
- Grundmann E. *Citología General*, Barcelona, Labor, 1967.
- Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. Human embryonic ítem-cell derivates fpr full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet*. 2009; 374(9703): 1745-53.
- Herreros J, Prosper F, Pérez A, Gavira JJ, García-Velloso MJ, Barba J, Sánchez PL, Cañizo C, Rábago G, Martí-Climent JM, Hernández M, López-Holgado N, González-Santos JM, Martín-Luengo C, Alegría E. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived ítem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2003; 24(22) 2012-20.
- Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt, B, Thyssen S, Gray Ad, Bathia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21(7): 763-70.
- Hongpaisan J, Roomans GM. Retaining ionic concentrations during in vitro storage of tissue for microanalytical studies. *J Microsc.* 1999; 193(Pt 3): 257-67.
- Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med*. 2005; 9(3): 592-608.
- Horowitz MM. Current status of allogeneic bone marrow transplantation in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2000; 37(1): 30-42.

- Horwitz EM, Blanc KL. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7: 393-95.
- Hoskins JM, Meynell GG, Sanders FK. A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Exp Cell Res*. 1956; 11(2): 297–305.
- Hwang WS, Lee BC, Lee CK, y Hang SK. Cloned human embryonic stem cells for tissue repair and transplantation. *Stem Cell Rev*. 2005; 1: 99-109.
- Ishisaki A, Hayashi H, Li AJ, Imamura T. Human umbilical vein endothelium-derived cells retain potential to differentiate into smooth muscle-like cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(2): 1303–1309.
- Jaluria P, Chu C, Betenbaugh M, Shiloach J. Cells by design: a mini-review of targeting cell engineering using DNA microarrays. *Mol Biotechnol*. 2008; 39(2): 105–111.
- Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J. A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microb Cell Fact*. 2007; 6: 4.
- Janes SM, Lowel S, Hunter C. Epidermal stem cell. *J Pathol*. 2002; 197(2): 479-91.
- Jia L, Srinivasula SM, Liu FT, Newland AC, Fernandes-Alnemri T, Alnermi ES, Kelsey SM. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood*. 2001; 98: 414-21.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada A, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893): 41-9.
- Jiménez JM. *Control de calidad in vivo de constructos de piel humana elaborada por ingeniería tisular*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 2009.
- Johnson EM Jr, Deckwerth TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci*. 1993; 16: 31-46.
- Johnston WK, Unrau PJ, Lawrence MS, Glasner ME, Bartel DP. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science*. 2001; 292: 1391-1325.
- Jorcano JL. Aspectos biotecnológicos: Aplicaciones preclínicas y clínicas de piel generada a partir de células madre epidérmica. En: *Células Madre y Terapia Regenerativa*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2009. pp 223-57.
- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukan A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007; 25(2): 319–331.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissues. *Br. J. Cancer*. 1972; 26: 239-257.
- Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008; 32(7): 724–732.
- Kerr DA, Llado J, Shablott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, Krishnan C, Dike S, Gearhart JD, Rothstein JD. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor injury. *J Neurosci*. 2003; 23:5131-40.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez- Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002; 418: 50-6.
- Kleinsmith LJ, Pierce GB Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 1964; 24:1544-51.
- Gluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997; 275: 1132-36.
- Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruffrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*. 2002; 346(10): 738-46.
- Kordon C. *El lenguaje de las células*, Madrid, Alianza, 1994.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105(3): 369-77.
- LaCasse EC, Holcik M, Korneluck RG, Mackenzie AE. Apoptosis in health, disease, and therapy: overview and methodology. En: *Apoptosis in Health and Disease*. Cambridge University Press. Cambridge. 2005 pp. 1-48.
- Lackie JM, Dow JA. *The Dictionary of Cell Biology*, London. Academic Press. 1989.

- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Osborne L, Wang X, Finegold M; Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000; 6(11): 1229-34.
- Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D, *et al*. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J Biotechnol*. 1992; 25: 231-243.
- Lehninger AL. *Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona. 1972.
- López Escamez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A. Standard for quantification of elemental in the otolithic membrana by electron probe X-ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensitivity. *J. Microsc*. 1993; 171: 215-22.
- López Guerrero JA. Células madre y nuevas terapias. Una visión general. En: *Células Madre y Terapias Regenerativas*. Real Academia Nacional de Farmacia. 2009. pp 25-58.
- Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006; 91(8): 1017-1026.
- Luisi PL, Ferri F, Stano P. Approaches to semisynthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften*. 2006; 93: 1-13.
- Luisi PL, Oberholzer T, Lazcano A. The notion of DNA minimal cell: a general discourse and some guidelines for an experimental approach. *Helvetica Chim. Acta* 2002; 85:1759-77.
- Luquin MR, Moya MA. *Presente y futuro de la terapia celular en el tratamiento de la enfermedad de parkinson*. Barcelona. Ars Médica. 2005.
- Luria S. *La vida experimento inacabado*. Alianza. 1975.
- Maeno E, Ishizaki, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of fluid volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 2000;97:9487-9492.
- Majno G y Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*. 1995; 146:3-15.
- Marañón G. *Obras Completas*. Tomo 1. Espasa Calpe. Madrid. 1966.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78 (2): 7634-7638.
- Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122(6): 877-91.
- McCaskill JS, Packard NH, Rasmussen S, Bedau MA. Evolutionary self-organization in complex fluids. *Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci*. 2007; 362(1486): 1763-79.
- McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans*. 1991; 19(S1): 29.
- Meana A, Iglesias J, del Río M, Larche F, Madrigal B, Fresnos MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a thermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998; 24: 621-30.
- Mercé LT. *Células Madre. Preguntas y respuestas sobre la donación y conservación de sangre del cordón umbilical*. Panamericana. Madrid. 2009.
- Meldrum BS. Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives. *Prog. Brain Res*. 2002; 135: 3-11.
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006, 113: 1287-94.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005; 23(10): 1549-1559.
- Miller SL. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. *Science*. 1953; 117: 528-29.
- Mingote A.; Sánchez Ron JM. *Viva la Ciencia*, Barcelona, Critica. 2008.
- Mohr LR, Trounson AO. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J Reprod Fertil*. 1980; 58(1): 189-196.
- Monod J. *El azar y la necesidad*. Barral. Barcelona. 1973.

- Montalvo A. *Evaluación genética y microanalítica de las células madre de la gelatina de Wharton para su utilización en ingeniería tisular*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2008a.
- Montalvo A, Garzón I, González-Andrades M, Lobo M, Fernández-Montoya A, Alaminos M, Campos A. Evaluación de la viabilidad de los cultivos de condrocitos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X. *Boletín de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT)*. 2008b; 9:3-7.
- Mushegian AR, Koonin EV. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1996; 93: 10268-73.
- Nakamura N, Miyama T, Engerbretsen L, Yoshikawa H, Shino K. Cell-Based therapy in articular cartilage lesions of the Knee. *J. Arthroscopy and Related Surgery*. 2009; 25(5): 531-52.
- Nelson PT, Kondziolka D, Werchler L, Goldstein S, Gebel J, DeCesare S, Elder EM, Zhang PY, Jacobs A, McGrogan M, Lee VMY, Trojanowski JQ. Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol*. 2002; 160(4): 1201-6.
- Nieto-Aguilar R, Serrato D, Garzón I, Campos A, Alaminos M. Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells (ASCs) in a novel fibrin-agarose scaffold. *J. Biomaterials Applications*. 2010; [en prensa].
- Nombela C. *Células madre. Encrucijada biológicas para la Medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta*. Edaf. Madrid. 2007.
- Nüsslein-Volhard, CH. *Génesis y desarrollo de la vida*. Barcelona. Crítica. 2009.
- Oparin AI. *The Origin of Life on the Herat*. 3ª ed. Edimburg, Oliver and Boyd. 1957.
- Ortega y Gasset, J. Meditaciones de nuestro tiempo. Introducción al presente. En: *Obras Completa. Tomo VIII (1926-1932). Obra póstuma*. Taurus. Madrid. 2008. pp. 31-114.
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol*. 2001;532:3-16.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, Mckay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A; Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410: 701-05.
- Ortiz Picón JM. *Citología General*. Labor. Barcelona. 1947.
- Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994; 177(1-2): 101-111.
- Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, López-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*. 2007; 131:364-77.
- Park C, Moon DO, Ryu CH, Choi B, Lee W, Kim GY, Choi Y. Beta-sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(3): 341-348.
- Patterson MK Jr. *In measurement of growth and viability of cells in culture*. 1ª ed. New York: IH Pastarf, Academic Press, 1979; pp. 150-155.
- Perales S, Alejandro MJ, Linares A. *Apoptosis en células de músculo liso arteriales*. Universidad de Granada. Granada. 2007.
- Pérez de Vargas I, Vidal L. *La célula humana*. Málaga, Universidad de Málaga, 1983
- Phillips HJ. *In dye exclusion tests for cell viability*. 2ª ed. New York: Academic Press, 1973; pp. 406-411.
- Pilet PE. *La Célula*. Toray-Masson. Barcelona. 1968.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143-147.
- Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, Galli R, Del Carro V, Amadio S, Bergami A, Furlan R, Comi G, Vescovi AL, Martino G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*. 2003; 422(6933): 688-94.
- Pohorille A, New MH. Models of protocellular structures, functions and evolution. En *Proc. XII Recontres de Blois "Frontiers of Life"* (eds. L.M. Celniker & J. Tran Thanh Van), Hanoi, Vietnam: The Gioi Publishers. 2001. pp-37-42.
- Pohorille A, Schweighofer, K; Wilson, MA. The origin and evolution of early membrane channels. *Astrobiology*. 2005; 5: 1-17.

- Potten Ch. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinetics* 1974; 7: 77-88.
- Potten Ch, Wilson J. Dead or alive. En: *Apoptosis. The life and Death of cells*. Cambridge University Press. Cambridge.2004;pp.1-7.
- Pozzobon M, Ghionzoli M, de Coppi P. ES, iPS, MSC, and AFS Cells. Stem cells exploitation for Pediatric Surgery: current research and perspective. *Pediatr Surg Int*. 2010; 26(1): 3-10.
- Prigogine I. *Las leyes del caos*. 2ª ed. Crítica. Barcelona. 2004.
- Prósper F, Verfaillie. Células madre adultas: fuentes, características y perspectivas sobre su uso terapéutico. En: *Investigación con células troncales*. Monografías Humanitas. Barcelona. 2004. pp 7-22.
- Qu-Petersen Z, Deasy Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J; Cao B, Gates C, Wernig A. Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2002; 157: 851-64.
- Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19: 1–22.
- Ramón y Cajal S. *Manual de Histología normal y de técnica micrográfica para uso de estudiantes*, Madrid. 7ª ed. 1921.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos –Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*. 2000; 25(2): 425-35.
- Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*. 2006; 441(7097): 1080–1086.
- Rao Ms, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*. 2001; 122(7): 713–734.
- Rasmussen S, Chen I, Nilsson M, Abe S. Bridging nonliving and living matter. *Artif. Life*. 2003; 9: 269-316.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 1992; 359(6395): 550–551.
- Reynolds BA, Weiss Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255: 1707-10.
- Rifkin J. *El siglo de la biotecnología*, Barcelona, Critica, 1999.
- Rinaldi M, Tricarico M, Bonmassar E, Parrella P, Barrera G, Fazio VM. Effect of 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, on NK susceptibility of human K562 target cells. *Anticancer Res*. 1998; 18(5A): 3591–3595.
- Rodriguez IA, Fernández-Segura E, Ceballos G, Arrebola F, del Carmen Sánchez-Quevedo M, Campos A. Hybrid cell death induced by exposure to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): an ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent*. 2008; 10(2): 105–111.
- Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, Campos A. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg*. 2008; 22(3): 440–448.
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21(1): 105–110.
- Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater*. 2002; 3: 1–8.
- Roomans GM. X-ray microanalysis of cultured cells in the scanning electron microscope and in the scanning transmission electron microscope: A comparison. *Scanning Microsc*. 1999; 13(1): 159–165.
- Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial cell monoculture. *Methods Mol Biol*. 2002b; 188: 273–289.
- Rosenfeld N, Young JW, Alon U, Swain PS, Elowitz MB. Gene regulation at the single-cell level. *Science*. 2005; 308: 1962-65.
- Rotman B, Papermaster BW. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1966; 55(1): 134–141.
- Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 2001; 19(6): 477-82.
- Sádaba I. *Cyborg. Sueños y pesadillas de las tecnologías*, Barcelona, Península, 2009.

- Salido M, Vilches J, Roomans GM. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 2004; 28(5): 397–402.
- Sánchez García A.; García-Sancho J. Reparación cardíaca con células madre. En: *Células Madre y Terapias regenerativas*. Real Academia Nacional de Farmacia. 2009. pp. 259- 275.
- Sánchez-Quevedo MC, Crespo PV, Garcia JM, Campos A. X-ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner.* 1989; 6(3): 323–329.
- Sánchez-Quevedo MC, Alaminos A, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs Developer by tissue engineering. *Histology and Histopathology.* 2007; 22: 631-40.
- Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y, Ikeda S, Ogawa H. Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. *J Dermatol Sci.* 2005; 37(1): 29–39.
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells.* 2005; 23(2): 220–229.
- Schneider ED, Sagan D. *La termodinámica de la vida. Física, cosmología, ecología y evolución*. Tusquet. Barcelona. 2008.
- Schrödinger E. *¿Qué es la vida?*. 7ª ed. Tusquets. Barcelona. 2008.
- Seale P, Rudinicki MA. A new look at the origin, function, and “stem cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000; 218(2): 115-24.
- Sevin BU, Perras JP, Averette HE, Donato DM, Penalver M. Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer.* 1993; 71(S4): 1613-20.
- Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(23): 13726–13731.
- Smith, E & Morowitz, HJ. Universality in intermediary metabolism. *Proc. Nat. Aca Sci USA.* 2004; 101(36): 13168-73.
- Skepper JN, Karydis I, Garnett MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mitchinson MJ, Cary NR. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: an X-ray microanalytical study. *J Pathol.* 1999; 188(1): 100–106.
- Slack JMW. *Essential developmental biology*. 2ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2002.
- Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature.* 2006; 441: 1060.
- Solé RV, Munteanu A, Rodríguez-Caso, C, Macia J. Synthetic protocell biology: from reproduction to computation. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2007; 362:1727-39.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson’s disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* 2009; 136(5): 964-77.
- Stevens LC. Mouse genital ridges in organ culture: the effects of temperature on maturation and experimental induction of teratocarcinogenesis. *Differentiation.* 1983; 24(1): 60-4.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernández A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002; 106: 1913-18.
- Syntichaki P, Tavemarakis MV. Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *Embo Rep.* 2002, 3: 604-609.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 131(5): 861-72.
- Tao SC, Chen CS, Zhu H. Applications of protein microarray technology. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2007; 10(8): 706–718.

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282(5391): 1145–1147.
- Thowfeegu S, Myatt EJ, Tosh D. Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev Dyn*. 2007; 236(12): 3208–3217.
- Torella D, Ellison GM, Nadal-Ginard B, Indolfi C. Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicina. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15: 229-36.
- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008; 26(3): 591–599.
- Trump BF; Berezsky IK. The role of altered (CA<sup>2+</sup>) regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1313:173-178.
- Tsai RY, Kittappa R, Mckay RD. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell*. 2002; 2(6):707-12.
- Turing AM. Computing machinery and intelligence. *Mind*. 1950; 49: 433-60.
- Urbanek K, Cessesli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, BearziC, Boni A, Bolli R, Kajsura J, Anversa P, Leri A. Stem cell niches in adult mouse hart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 9226-31.
- Urtubey L. *Elementos de Histología*. Vol I-II. Editorial Alhambra. Madrid.1931.
- Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, Chuah MK. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2002; 2(2): 195–209.
- Vaux DL. Apoptosis timeline. *Cell Death Differ*. 2002; 9: 349-54.
- Von Neumann, J. “The General and Logical Theory of Automata”, conferencia dada en 1948, en L. A. Jeffress (ed.), *Cerebral Mechanisms in Behaviour*. The Hixon Symposium, Nueva York, Jhon Wiley, 1951, pp. 1-41.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7): 1330–1337.
- Wang X, Ge J, Wang K, Qian J, Zou Y. Evaluation of MTT assay for measurement of emodin-induced cytotoxicity. *Assay Drug Dev Technol*. 2006; 4(2): 203–207.
- Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int*. 1994; 18(9): 915–916.
- Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*. 2000; 287(54547):1427-30.
- Wachtersháuster G. Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Porg Biophys Mol Biol*. 1992; 187: 483-94.
- Watson JD, Crick F. A structure for desoxiribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-8.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000; 100: 157-68.
- Wong DC, Wong KT, Lee YY, Morin PN, Heng CK, Yap MG. Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 94(2): 373–382.
- Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, Liu YL. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2007; 100(3): 608–616.
- Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Yang NS. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blond for support of longterm hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(25): 12140-12144.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858): 1917-20.
- Yu SP, Canzoniero LMT, Choi DW. Ion homeostasis ans apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2001, 13: 405-11.
- Zabiti S. *Alteración de la homeostasis iónica durante la lesión celular inducida por hipoxia metabólica. Papel de los iones monovalentes*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2002.
- Zapata AG. La biología de las células madres: base de su aplicación clínica. En: *Medicina regenerativa e ingeniería tisular. Del laboratorio a la clínica*. Alfil. México. 2009. pp. 71-84.

Zhang Y, Zhao L, Wang C, Lei B. The comparison of biologic character between mouse embryonic fibroblast and human embryonic fibroblast. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2003; 20(2): 251-4.

Zhao B, Zhong M, Jin K. Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human. *Panminerva Med*. 2008; 50: 55-64.

Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*. 2007; 134(22): 3959–3965.

Zubiri X. *El hombre y Dios*. 7ª ed. Alianza editorial. Madrid. 2003.

## Contestación del Prof. Campos

Excma. Sra. Presidente  
Excmo. Sr. Presidente del Instituto de Academias de Andalucía  
Excmas. e Ilmas. Autoridades  
Ilmo. Sras. y Sres. Académicos  
Sras. y Sres.

El filósofo alemán Friedrich Wilhelm Nietzsche afirma que la vida esta hecha de rarísimos momentos de gran intensidad y de innumerables intervalos. Y solía añadir que como los hombres no valoran, en general, los momentos mágicos acaban viviendo solo los momentos intermedios.

En el acto que hoy celebramos, soy consciente de vivir un momento de gran intensidad, un momento mágico, que nunca pude llegar a imaginar cuando a mediados de los años setenta tuve la oportunidad y el privilegio de conocer a Vicente Crespo en una universidad, en una sociedad y en un País en el que todo era futuro y horizonte.

La generosidad de nuestra Presidente y de la Junta de Gobierno me permite en efecto responder el discurso de ingreso que acaba de pronunciar en nuestra Academia el Profesor Vicente Crespo Ferrer y me permite glosar por tanto, aunque sea con la brevedad y la síntesis que requiere el caso, su trayectoria humana y científica y el contenido de su excelente discurso.

Tengo para ello una ventaja y un inconveniente. La primera es el alto grado de conocimiento que tengo del protagonista pues creo que es la persona con la que, aparte de mi familia, he convivido mas horas desde que lo conocí en otoño de 1974 cuando yo comenzaba mi actividad como profesor ayudante y él iniciaba sus estudios en la universidad. La desventaja es también muy evidente y es que yo no puedo diseccionar la personalidad y la obra de Vicente Crespo con la frialdad y la objetividad de un naturalista. Por un lado porque mi aproximación a su persona rebosa afecto y amistad, un afecto y una amistad, que ni el tiempo, ni las circunstancias han logrado cuartear y, por otro lado, porque mi propia trayectoria personal y profesional esta tan unida a la suya que, en muchos casos, me resulta muy difícil deslindar cuales de mis ideas son suyas o cuales de las suyas son mías. A pesar de ello o quizá gracias a ello con los martillos y los cinceles del conocimiento, el afecto, la amistad y la complicidad intentaré esculpir y modelar su figura.

¿Que rasgos caracterizan la vida y la obra de Vicente Crespo? A mi juicio tres: la fidelidad, la voluntad y el saber estar, no entendido este último como una actitud correcta y educada ante los demás, que también, sino como una actitud filosófica en el sentido que da al saber estar la filosofía de Arnold Davidson.

La fidelidad es en Vicente Crespo columna vertebral de su personalidad. Una fidelidad en primer lugar a si mismo sin la cual, como he comentado muchas veces, no es posible ni poseer ni ejercer ninguna otra, una fidelidad, en

segundo lugar, a un proyecto al que ha dedicado lo mejor de su inteligencia y su trabajo -el proyecto de una biología celular y tisular en la universidad aplicada y orientada a la medicina- y, por último una fidelidad sin fisuras hacia las personas y hacia las instituciones a las que ha dedicado y dedica su vida. Permitidme glosar algunos hitos de estas tres fidelidades.

Vicente Crespo es un hombre religioso que goza del regalo de la fe. Sin este rasgo de su carácter, que ejerce sin ningún tipo de estridencia, y que quizá violo al hacerlo público en este momento, no podría comprenderse su actitud ante la vida ni ante el mundo. Pero Vicente Crespo es también un hombre fiel a su origen portuense y alicantino. Una mezcla a mi juicio excelente al combinar el carácter emprendedor y laborioso de los levantinos con el espíritu aventurero e irónico de los hombres y mujeres del Puerto de Santa María. Sin tener en cuenta este componente originario es muy difícil entender la personalidad y el quehacer vital de Vicente Crespo. La fidelidad a sí mismo se manifiesta también en la fidelidad a su familia por la que siente una devoción muy especial. Como suelo repetir con frecuencia, siguiendo la estela marcada por Don Miguel Guirao, con cada nuevo académico ingresa también su familia que hoy recibe, con este acto, la compensación a muchos años de sacrificio, preocupaciones e incertidumbres. He tenido el privilegio de vivir junto a Vicente Crespo algunos momentos familiares tristes y alegres, como la temprana muerte de su padre siendo estudiante o más recientemente la de su única hermana, o su boda, o el nacimiento de sus hijos, o muchas otras y en todos esos momentos he visto a un Vicente Crespo viviendo intensamente el protagonismo de su fidelidad familiar como eje fundamental de su existencia. De la fidelidad al proyecto científico al que ha dedicado su vida profesional y que finalmente le ha conducido hasta esta Casa soy testigo de primera fila. A mediados de los años setenta, impregnados por los vientos de cambio que trajo la transición política un grupo de estudiantes del Colegio Mayor Beato Diego de Cádiz, entre los que se encontraba Vicente Crespo promovió ante su director, nuestro antiguo y querido compañero de Academia el Profesor D Juan Ocaña, una pequeña revuelta "invitándole" entre comillas a que nombrase jefe de estudios del colegio a un joven profesor ayudante de histología que parecía ser del agrado de la mayoría de los estudiantes del colegio y que no era otro que el que en este momento les habla. Así lo hizo el profesor Ocaña y de este modo Vicente Crespo y yo comenzamos a convivir horas y horas en todas las actividades del Colegio

En innumerables conversaciones que mantuvimos entonces, en muchas de las cuales participaron también los profesores Ocaña y Rico, actual académico de esta casa, y residente entonces como profesor en el Colegio Mayor, hablamos sobre histología, sobre universidad, sobre libros, sobre cine, sobre utopías, sobre reformas y sobre todo sobre nuestros sueños. Allí, entre otras cosas, le hable de mi idea de transformar una histología oxidada entonces, por farragosa y superfluas descripciones, en una ciencia más viva y más útil para la medicina. Y allí en ese contexto Vicente Crespo fue fraguando su proyecto y madurando la posibilidad de dedicarse a la célula y a la histología en la universidad, un proyecto que, pensó, podía satisfacer sus inquietudes científicas, culturales, profesionales y sociales. Tras una conversación que tuvimos en un viejo café gaditano – la casa Dorada- ante mi inminente marcha

como profesor agregado a la Facultad de Medicina de Oviedo, tras haber ganado la correspondiente oposición, Vicente Crespo, que acababa de terminar su carrera, me comunico su decisión definitiva de dedicarse a ese proyecto y su deseo de acompañarme a Oviedo.

Y a servir ese proyecto ha contribuido desde entonces. Renunció primero a la plaza de MIR que brillantemente había obtenido y se vino a Oviedo con una plaza de escasa dotación económica y lo mismo hizo cuando con posterioridad accedí y me traslade a la Universidad de Granada. En nuestra universidad ha sido profesor ayudante, colaborador, Profesor Titular y Catedrático, en este último caso tras haber ganado primero las oposiciones en la Universidad de Oviedo y residir en el Principado aproximadamente dos años a mitad de los noventa.

Su renuncia al MIR para dedicarse a algo tan inseguro como la biología celular y la histología en el otro extremo del País y su decisión de opositar para ser catedrático fuera de su universidad, con un sistema que primaba a los candidatos locales, en vez de esperar a serlo en la Universidad de Granada, constituyen, a mi juicio dos excelentes ejemplos de su fidelidad al proyecto científico y universitario elegido.

Sus proyectos de investigación, trabajos y participación en numerosos congresos nacionales e internacionales, que no puedo pormenorizar aquí, lo han convertido además, en todos estos años, en una figura respetada y admirada dentro del marco de la biología celular y la histología española alcanzando en tiempos recientes la presidencia de nuestra Sociedad científica. Con prestigio y trabajo intenso, su fidelidad al proyecto científico y universitario elegido ha sido, por tanto, y desde la primera hora, clara, rectilínea, creciente y sin ningún tipo de meandro.

Pero Vicente Crespo es también fiel, y en un altísimo grado, a las personas y a las instituciones a las que sirve. En primer lugar fiel a la amistad. Yo soy, en este sentido, un protagonista privilegiado de su generosidad y de su fidelidad amistosa. Hemos practicado ambos ese viejo principio que he oído repetir muchas veces a nuestro querido compañero de academia y amigo Vicente Pedraza según el cual el amor y la amistad son calles de doble dirección y creo que ambos hemos cultivado una relación amistosa creativa, comprensiva y cómplice. Ambos hemos superado desde 1974 hasta nuestros días – y a ello ha contribuido seguramente mucho mas Vicente Crespo que yo – dos de los mas graves peligros que acechan a la amistad: el ejercicio de un protagonismo individualista capaz de marginar la realidad vital del amigo y la falta de generosidad y confianza para superar cualquier problema que pueda surgir en el curso de la convivencia diaria. Sin hacer de la fidelidad amistosa su divisa, como figuraba por escrito en las espadas de algunos viejos guerreros, difícilmente hubiera podido soportar Vicente Crespo algunas de las provocaciones y trampas que a ambos nos han tendido.

De su fidelidad a los respectivos decanos, rectores y órganos colegiados de la universidad baste señalar las opiniones que todos ellos tienen sobre su figura con independencia de que en muchos casos Vicente Crespo no haya

estado de acuerdo con algunas de sus decisiones y se lo haya hecho saber, eso si con la mayor consideración y respeto.

La voluntad es el segundo gran rasgo de Vicente Crespo del que hablaba al comienzo de este discurso. Se trata, a mi juicio, de una voluntad que se caracteriza por poseer un doble horizonte. Por un lado una clara voluntad de construir, por otro una clara voluntad de servir, de ser útil. Ejemplo del primer caso es, en ámbito profesional, el desarrollo pionero en Granada y en España del Microanálisis con Microscopia electrónica Analítica de rayos X aplicado a células y tejidos. Cuando en Granada pudimos adquirir a principio de los ochenta, gracias a una Ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica del Ministerio, el primer Microscopio Electrónico de Barrido y el primer Detector de Energía Dispersiva de Rayos X que existió en nuestra universidad, no tuve duda alguna en encargar a Vicente Crespo, profesor ayudante entonces, la responsabilidad de ponerlo en marcha. La tarea de aplicar a la biología celular la investigación citoquímica de los iones con microscopia electrónica analítica era muy difícil y, como he señalado antes, pionera en España. Su capacidad de trabajo y su voluntad constructiva sustentada en la fidelidad al proyecto elegido, al que antes aludí, convirtió muy pronto a nuestra Facultad en referencia nacional y a Vicente Crespo en uno de los expertos más importantes en dicho campo. Su estancia en Alemania y la colaboración con el Profesor Hans Höling de la Universidad de Munster y con la profesora Alice Warley del King's College de Londres han convertido también a nuestra unidad en un foco importante a nivel internacional de la investigación con microscopia electrónica analítica. En nuestros días los estudios realizados en Granada por él y por otros miembros de nuestro grupo, entre los que quiero destacar a los profesores Fernández-Segura, García López, Sánchez-Quevedo y Alaminos Mingorance, constituyen la base para determinar con mas exactitud, que con ninguna otra técnica, el estado real de viabilidad de las células que se utilizan en los programas de terapia celular que están empezando a implantarse.

Su voluntad de construir se expresa asimismo de forma muy clara en el impulso de las relaciones humanas, tan fundamentales para engrasar afectivamente una sociedad crispada en demasía por intereses, recelos, calumnias, envidias, egoísmos o simples vanidades. Vicente Crespo alisa cada día las aristas entre los seres humanos que conviven con él y aunque eso a veces le reporta golpes de vientos contrarios a su naturaleza, él lo da, en general, por bien empleado porque en su horizonte la utopía posibilista supera siempre a la cruda y a veces ridícula realidad de cada día

Vicente Crespo posee también una decidida voluntad de servir, una voluntad que ejerce con la discreción con la que se ejercen las obras verdaderamente importantes. Voy a poner como ejemplo de su voluntad de servicio su participación en obras sociales vinculadas a la orden hospitalaria de San Juan de Dios y a la de los Agustinos Recoletos. Estoy seguro de incomodar su modestia pero seria infiel a su glosa si mutilo este ámbito de su personalidad y lo oculto a luz de todos los que aquí, en esta importante hora de su vida, hemos venido también a rendirle homenaje

El tercer rasgo de la personalidad de Vicente Crespo, como comentaba al principio de esta intervención, es su saber estar. Davidson ha propuesto una filosofía del saber estar en el mundo que consiste en la aceptación atenta, equilibrada diría yo, de todos los instantes, que inciden en la realidad vital de un individuo, incluyendo incluso los imperceptibles. Como ocurre en la denominada Ley de los grandes números el conjunto de todos los posibles instantes que nos aporta la vida responde si los aceptamos en masa a promedios generales perfectamente estables. Se trata por ello de una propuesta que podría describirse como la de un ser humano inserto en el mundo de su tiempo que acepta equilibradamente todos los cambios y estímulos a los que está inexorablemente sometido. La imagen de un ser humano que sabe estar en el mundo es la de un ser que nos infunde confianza y nos transmite armonía ante el combate diario; es la imagen de un ser que ante su realidad vital nos muestra generosidad, aceptación y entrega, sensibilidad, pasión y laboriosidad; la imagen de un ser que ofrece a sus semejantes una estética de nobleza y de fraternidad natural.

Vicente Crespo es un hombre que sabe estar en el mundo en el sentido que acabo de dibujar y ninguna de las cualidades que he aplicado al prototipo descrito le es ajena. Vicente es equilibrado y apacible y aunque esta lleno de pasiones, estas no parecen alterar ni su conducta ni su comportamiento. Permítanme ponerles dos ejemplos

Una vez, al comienzo de su formación, interpelado sobre la sinceridad de su dedicación al mundo de la célula por uno de esos personajes resabiados que tratan, a veces, de intimidar y desanimar a los más jóvenes, Vicente Crespo respondió con el saber estar y la sorna que le caracteriza: -A lo que me dedico, lo que me interesa, es cortar al micrótopo-. Y el interpelante hubo de marcharse sin respuesta y sin haber cumplido su objetivo.

Otra vez tras haber preparado su ejercicio de oposiciones, a la antigua usanza, en el aula Emilio Muñoz de nuestra facultad y escucharse a través de las paredes del aula mi elevado tono de voz insistiendo, entre otras cosas, en un correcto uso del puntero, el bedel de turno le dijo a Vicente Crespo tras salir del aula y en mi ausencia: -No se como lo aguanta y como no le parte el puntero en la cabeza-. He de aclarar que yo soy o era muy exigente en la preparación conceptual y formal de las oposiciones antes de que las cátedras y titularidades se obtuvieran sin necesidad actuación pública, y quiero pensar que ello ha contribuido, por supuesto junto a la muy elevada calidad de los opositores, a que cinco catedráticos y ocho profesores titulares de Biología Celular e Histología hayan nacido para la Universidad española, desde nuestro modesto grupo granadino. Pues bien, volviendo a la anécdota, por persona ajena a Vicente, supe lo que este contesto al bedel con toda la serenidad del mundo: -No creo estar aguantando nada, afirmó Vicente, lo que hace lo esta haciendo por mi bien. Su respuesta equilibrada, ajena a cualquier desahogo, quizá justificado, contra el autor de las voces o complaciente y lisonjero con su interlocutor, creo que refleja el saber estar del nuevo académico.

Así es Vicente Crespo, un hombre rico en fidelidades, en voluntad y en la difícil filosofía del saber estar, una riqueza que ha puesto de relieve a lo largo

de su vida y del que hoy ha dado además buena prueba en el discurso que acabamos de escuchar.

Es en efecto su discurso una pieza ensayística rica en contenido, reflexiones y símbolos. Voy a analizarlo con brevedad, como es preceptivo en esta intervención de respuesta al discurso de ingreso, y lo haré tratando de incorporar sus reflexiones en el contexto de la ciencia y la medicina de nuestro tiempo.

Don Pedro Laín, en 1973, en su libro “La Medicina Actual”, afirma que son cuatro los rasgos que caracterizan a la medicina de nuestro tiempo: el ser una medicina tecnificada, preventiva, personalizada y socializada. Y en lo que atañe a la terapéutica afirma que son cuatro las distintas formas con las que un médico puede curar: se cura mediante la cirugía, se cura mediante la química, esto es mediante los fármacos; se cura mediante la física, esto es mediante radiaciones o agentes físicos y se cura finalmente mediante la palabra.

Desde que Don Pedro escribió estas reflexiones los rasgos que caracterizan a la medicina han cambiado poco pero a los instrumentos terapéuticos, a los cuatro modos de curar hay que añadir hoy un nuevo modo de hacerlo, un nuevo instrumento curativo que desde hace apenas treinta años ha comenzado a formar parte del arsenal terapéutico de los médicos. Se trata, como es obvio, de los órganos utilizados en los trasplantes y de las células y los tejidos naturales conservados en los biobancos o de los tejidos artificiales que se construyen actualmente en los laboratorios utilizando los nuevos protocolos de la ingeniería tisular.

En el discurso que acabamos de oír Vicente Crespo ha disertado sobre el devenir de la célula desde su inicial aparición en el tablero de la ciencia hasta el horizonte que sobre ella podemos vislumbrar en el futuro y lo ha hecho para que tengamos una conciencia cabal de lo que la célula es y significa en el contexto de la ciencia y la medicina de nuestros días.

Para hacerlo ha utilizado un recurso clásico: construir el concepto de célula en etapas, fases, propuestas o días sucesivos. Es el recurso que utiliza el autor del Génesis para, en seis etapas o días, explicar la creación del mundo, desde la luz y las tinieblas hasta la aparición del hombre y la mujer sobre la tierra; es el mismo número de días que utiliza el escritor Miguel Torga para construir su autobiografía, su visión del mundo; es también el número de personajes que en la inmortal obra de Pirandello buscan autor, es también el número de propuestas que Italo Calvino propone para el presente milenio; es, incluso el número de etapas que David Kern, experto en educación del Johns Hopkins, propone para implantar un nuevo plan de estudios de medicina. Vicente Crespo utiliza este recurso para explicarnos los distintos personajes que la célula ha sido para buscar su actual protagonismo y los elementos y propuestas que conforman su realidad vital, desde sus distintos componentes hasta su capacidad para dividirse y proliferar.

De su discurso quiero destacar dos ideas fundamentales que constituyen, a mi modo de ver, los ejes vectoriales del mismo. En primer lugar

el hecho de que ninguna de las aportaciones descritas en cada una de las etapas es superflua o carece de realidad en nuestros días. Cada una de ellas refleja simplemente una aproximación distinta a la biología celular con independencia de que la aproximación se lleve a cabo con diferentes instrumentos amplificantes o con técnicas de investigación celular muy distintas. Lo que, con mucha inteligencia describe el discurso es la secuencia cronológica de esas aproximaciones y el significado de vanguardia que tuvieron en su tiempo.

En segundo lugar el discurso resalta la existencia de una célula viva que se divide, prolifera y muere y que, gracias al conocimiento y al control cada vez mas exacto que hoy tenemos de dichas actividades, podemos utilizar en medicina como instrumento terapéutico. La evaluación asimismo de dichas actividades, con distintos métodos y técnicas, incluyendo la microscopia electrónica analítica, es la que nos permite además valorar la calidad y la eficacia de su uso en el tratamiento de distintas enfermedades.

Hasta alcanzar este punto el profesor Vicente Crespo lo que hace en su discurso, en este nuevo universo que la terapia celular y tisular representa para la medicina, es llevar a la práctica el viejo principio de Goethe según el cual todo lo que heredamos de nuestros padres debe volver a conquistarse para poder poseerlo. En efecto, en su discurso nuestro nuevo académico re-crea la célula en seis etapas, en seis días, para que conquistemos su conocimiento y podamos poseerlo en esta nueva hora de la medicina.

Sin embargo nuestro nuevo académico hace algo más: en vez de descansar el séptimo día, como hace Dios en el Génesis, nos regala un día más de trabajo, nos regala una etapa nueva en la que nos invita a mirar al horizonte. Ante nuestros asombrados ojos nos describe la célula del futuro, nos habla de la célula artificial, del nuevo sucedáneo que va a sustituir a la célula que puebla nuestro cuerpo y que, al parecer con éxito, empieza a ser eficaz en el tratamiento de algunos procesos morbosos.

Aunque solo lo ha esbozado su discurso nos deja entrever que las futuras células no solo van a ser útiles en la terapéutica sino que además van a poder mejorar los límites de sus funciones actuales. Algunos prototipos de células artificiales como los respirocitos o eritrocitos artificiales, los plaquetocitos o plaquetas artificiales y las microvivas o fagocitos artificiales pueden ilustrarnos sobre cual puede ser el futuro en este campo

A modo de ejemplo comentaré que los respirocitos son nanotankes de gases que pueden trasportar 9 mM de moléculas de Oxígeno o de Anhídrido Carbónico almacenadas a una presión de 1000 atmósferas. Un respirocito podrá aportar 236 veces mas oxigeno por unidad de volumen que los eritrocitos naturales. La sustitución del 20% de los eritrocitos circulantes por respirocitos artificiales permitiría a un individuo en reposo permanecer sin respirar durante 4 horas o correr dando una bocanada de aire cada 15 minutos. Otras posibilidades sorprendentes podríamos comentar a propósito de los plaquetocitos o de las microvivas fagocíticas. En su discurso Vicente Crespo

ha establecido las bases conceptuales en las que va a asentarse este futuro y sus palabras serán referencia obligada de reflexión en este campo.

Comenzaba el discurso haciendo referencia a los momentos de gran intensidad que proporciona la vida en comparación con los momentos de intervalo. Al dar la bienvenida en nombre de esta bicentenaria Corporación al Profesor Vicente Crespo quiero desearle que su actividad en nuestra Academia este regida siempre por esos momentos de intensidad que hacen que la vida, la personal y la científica en este caso, constituya un verdadero reto digno de vivirse.

El arte de vivir, cuenta una leyenda oriental, consiste en la habilidad de ver la llama, esto es en alcanzar los momentos intensos en que las cosas , mil veces vistas y entrevistas se transforman, como tocadas por un soplo, en soles esplendorosos que nos sonríen y desvelan sus secretos.

Desde aquel día, Querido Vicente, en que oíste a nuestro maestro, el casi nonagenario Profesor Gómez Sánchez, pronunciar su discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina de Cádiz, has convivido, en Cádiz y en Granada, con la presencia afectiva y cercana de una Real Academia de Medicina.

Por eso, y porque creo conocer muy bien las fuerzan que rigen tus sentimientos, se que a partir de hoy, el día de tu ingreso en esta Real Academia, vas a transformar en momento intenso, en llama, en sol esplendoroso, tu pertenencia a ella. Se, estoy convencido, que tu fidelidad, tu voluntad y tu saber estar van a tener, desde hoy a la Real Academia de Medicina como nuevo y amoroso destinatario.

Al darte la bienvenida a esta Casa quiero invitarte por último, a que esa llama, a que ese sol, en el que, estoy seguro, vas a convertir tu presencia en la Academia, brille entre nosotros con toda su intensidad e ilumine y caliente con su luz y resplandor nuestros aún ávidos cerebros y nuestros aún apasionados corazones.

Muchas gracias  
He dicho