

## La Embriología en el Siglo XX

El siglo XX supone un cambio cualitativo en el cual la Biología novecentista, basada en la tradición descriptiva de la Historia Natural, se transforma en una ciencia experimental, rigurosa en sus análisis e integradora en sus objetivos. En este cambio de mentalidad influyeron sobremanera los adelantos de la Química y la Física en las últimas décadas del siglo XIX y los primeros años (Heisenberg, DeBroglie, Einstein), del siglo XX. Frente al impresionante desarrollo teórico de la Física donde se alcanza un sentimiento de perfección, existe un paradigma teórico muy limitado en Biología. Esa desigualdad se empieza a compensar en las



CLAUDE BERNARD

primeras décadas del siglo XX con la aceptación de la selección darwiniana, y el conocimiento de las leyes de la herencia. De una forma gradual, la Teoría Celular fue mostrando su influencia profunda ya que permitía hacer generalizables los resultados obtenidos. El desarrollo del experimento en Fisiología se extendió a otros campos como la Embriología, con una concepción mecanicista basada en los estudios de Wilhelm Roux (1850-1924). El desarrollo del experimentalismo biológico, iniciado de una forma excepcional con los estudios del fisiólogo Claude Bernard, y fundamentado en modelos de trabajo científico, repetibles y comprobables, cristaliza en una apelación constante a los métodos físico-químicos. En este momento se produce un cambio conceptual clave en la Biología Celular pasándose de una "ascendencia anatómica", de ser una ciencia morfológica (quizá más patente aún en la Citología y la Histología), a convertirse en una Ciencia Biológica, la Biología Celular.

En la primera mitad del siglo XX surgen modificaciones que complementan el microscopio óptico y aumentan sus posibilidades de aplicación. Por otro lado, se llevan a cabo estudios teóricos que abrirán camino para el nacimiento de la microscopía electrónica. Así, Siendentoff y Zignondy (1905), diseñan el microscopio de campo oscuro, Leitz (1913), consigue el primer monoobjetivo binocular, Greenough y Czapaki aplican por primera vez las técnicas estereológicas, Zernicke (1934), el microscopio de contraste de fases, Heitinger (1868-1946), el microscopio de fluorescencia (1938), Casperson (1940), el microscopio de luz ultravioleta y Nomarski el microscopio de contraste interferencial (1952). Aunque para entonces se había llegado al "límite de capacidad del aumento microscópico" (según frase de Helmholtz en 1873), estos nuevos microscopios permiten ya desde su inicio avances conceptuales y nuevos descubrimientos.

En estas primeras décadas del siglo XX se produce el redescubrimiento de las leyes postuladas por Gregor Mendel. De esta forma se produce una primera ligazón entre la Genética y la Citología, identificándose al núcleo y en concreto a los cromosomas como portadores principales de los caracteres hereditarios.

Así, hay nuevos datos sobre la mitosis (Hertwig, Fleming, Fol), la meiosis (Van Beneden, Boveri) y estudios cromosómicos (Boveri, Belar).

Hay también nuevos avances en otros sentidos, como el desarrollo de técnicas de microcirugía (el empleo de microagujas y micropipetas manipulables con mandos a distancia ya había sido concebido por Purkinje), o el método microscópico para la observación, *in vivo*, de la circulación sanguínea desarrollado por O. Müller. Tras ellos, la microscopía intravital ha llegado a su mayoría de edad, habiéndose desarrollado métodos incluso para el estudio de estructuras opacas (microscopio Ultropak).

El avance lento y continuo de la microscopía óptica desde el siglo XV contrasta con el salto cualitativo que provocó la aparición de la microscopía electrónica. Los primeros pasos en la construcción del microscopio electrónico son dados por Knoll y Ruska quienes en 1928 construyen un prototipo con 2 lentes electromagnéticas. Sin embargo, las nuevas modificaciones que se introducían tales como el empleo de vacío y el bombardeo de la preparación con electrones provocan problemas técnicos y cierta desconfianza en los resultados. En 1933, Ruska construye un nuevo modelo de mucha mayor resolución equipado con una diferencia de potencial de 75.000 voltios. Seis años más tarde, la casa Siemens empieza a producir el aparato a escala comercial. En los años siguientes, y recorriendo con mucha mayor rapidez capítulos básicos de la historia de la microscopía óptica, se mejoran los inclusiones, los fijadores y los métodos de corte y tinción o contrastado.

Otros avances técnicos no estrictamente microscópicos han multiplicado nuestros conocimientos y nuestras herramientas de investigación. Entre ellos los cultivos *in vitro* de células y tejidos. Tras algunos experimentos pioneros en el siglo XIX, merece la pena destacar el trabajo de Harrison (1907), quien consiguió mantener fragmentos de médula espinal de anfibio en un coágulo linfático, demostrando además la posibilidad de crecimiento de los axones neuronales en este ambiente anómalo. En 1913, Carrel puso de manifiesto que células de distintos tipos podían mantenerse en condiciones controladas siempre que fueran nutridas con regularidad, eliminados los catabolitos y evitadas las contaminaciones. La importancia de esta tecnología llega treinta años más tarde cuando Rita Levi-Montalcini empieza a estudiar la importancia de proteínas específicas en el desarrollo del cultivo, descubriendo el factor de crecimiento nervioso y demostrando su importancia en el desarrollo neural. En 1955, Eagle pone en marcha la primera investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales para la supervivencia de las células en cultivo, demostrando que las células animales se pueden mantener en una mezcla de composición definida de iones y pequeñas moléculas, suplementada con una cantidad limitada de proteínas séricas. Ese medio, con determinadas variantes, lleva aún el nombre de Eagle. En los años setenta, Sato y su grupo de investigación son capaces de utilizar un medio de cultivo totalmente definido (sin suero ni extractos fetales), al que añaden específicamente cantidades exactas de diferentes hormonas y factores de crecimiento. En 1977, Wigler y Axel y sus colaboradores desarrollan un eficiente método para introducir genes humanos de copia única en el interior de células cultivadas, comenzando así una época de fructíferos descubrimientos. Entre los resultados evidentes de

esta línea de trabajo están los conocimientos sobre proliferación celular, realizar análisis bioquímicos y estructurales más exhaustivos, a la par que estudios de modificaciones metabólicas por la administración directa de distintos compuestos.

Los años setenta suponen otro salto cualitativo gracias al desarrollo de dos tecnologías de manejo del ADN recombinante: la clonación y la secuenciación.

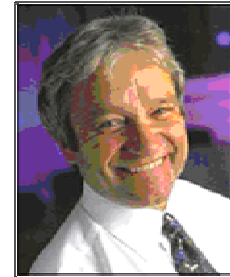


HERBERT BOYER

Herbert Boyer y Paul Berg utilizan enzimas de restricción para producir moléculas de ADN recombinante, es decir, de un híbrido del ADN celular y el de un vector. El vector entraba en una célula que al multiplicarse reproducía el ADN foráneo. Su descendencia mitótica formaba un clon. Esta clonación se completaba con las técnicas de secuenciación desarrolladas por Fred Sanger y Walter Gilbert que permitían identificar la secuencia de fragmentos de ADN de varios cientos de bases. En 1986 se anuncia la "Iniciativa del Genoma Humano" convertida más tarde (1990), en "Proyecto Genoma Humano". En 1985, Craig Venter y su grupo publican la secuencia del ADN de un microorganismo en vida libre. Se trata de la bacteria *Haemophilus influenzae*, cuyo genoma contiene 1,8 millones de bases, aún lejos de los 3.000 millones de bases del genoma humano (en la actualidad el número de procariontes de los que su genoma ha sido completamente secuenciado es superior a 45). Un año después, se secuencian el genoma del primer eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, dotado de 12 millones de bases. En 1998, se secuencian el genoma del primer organismo pluricelular, el del nematodo *Caenorhabditis elegans*, de 97 millones de bases. El desarrollo alcanza su grado máximo con la publicación en el año 2000 del primer borrador del genoma humano (entre cinco y quince años antes de lo previsto). El mismo año se descifra el genoma de *Drosophila melanogaster* y *Arabidopsis thaliana*, estando prevista para el presente año la finalización del genoma del ratón.

Junto a los logros cosechados en el genoma, se consiguen enormes avances en los procesos de transferencia nuclear. En 1942 se habían obtenido ya embriones a partir de blastómeros aislados a partir de estadios de dos células (ratas), o de hasta ocho células (conejos). En 1983, James McGrath y Davor Solter obtuvieron un individuo mediante transferencia de núcleos. En 1986, S.M. Willadsen clona una oveja a partir de células embrionarias. Un año más tarde, Ian Wilmut clona a Dolly, el primer mamífero obtenido a partir de la clonación de una célula adulta. En 1998, John Gearhart obtiene líneas de células madre a partir de embriones abortados. Clonación y células madre han supuesto una enorme polémica social por su potencial científico y problemas éticos. Probablemente nunca desde el desarrollo de la energía atómica ha estado tan presente en la preocupación colectiva el impacto de los avances científicos.

En 1953 se pusieron las bases de la comprensión del ciclo celular. Alma Howard y Stephen Pelc demostraron por métodos autorradiográficos que sólo se producía síntesis de ADN en un intervalo acotado dentro de la interfase, por lo que se definen las fases G1, S y G2. En 1974, R.D. Kornberg estudia como se organiza el ADN y elabora el primer modelo de nucleosoma. Yoshui y Clement Marker postulan en 1971 el factor promotor de la mitosis que es aislado en 1988 por Alfred Lohka y otros. Un año más tarde, Leland Hartwell y Ted Weinert describen los puntos de control ("checkpoints"), en el control del ciclo celular. Ese control es diseccionado proteína a proteína y gen a gen utilizando mutantes de levaduras. Así, Paul Nurse y otros identifican las quinasas dependientes de ciclina y las interacciones que desarrollan entre sí. Un punto clave fue el descubrimiento en 1991 por Michael Glotzer, Andrew Murria y Marc Kirschner del papel fundamental de la proteólisis en el mantenimiento de niveles regulados de una clase de ciclinas, la B. El responsable de ello era el complejo promotor de la anafase o ciclosoma. Dos años más tarde se aislaban los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina y por tanto un regulador principal del ciclo celular.



PAUL NURSE

A lo largo del siglo XX se avanzó considerablemente en la explicación de los mecanismos de interacción entre diferentes células y entre diferentes tejidos a lo largo del desarrollo pre y postnatal. En 1978, Edward Lewis describe el complejo *bithorax* y dos años más tarde, Nüsslein-Volhard y Wieschauss, futuros premios Nobel, identifican mutantes maternos y cigóticos en *Drosophila*. En 1984 se consigue otro avance espectacular con la identificación de las secuencias *homeobox*. En un estudio paso a paso se han identificado los distintos genes involucrados en distintas fases de desarrollo, estableciéndose una jerarquía de actividad. Así del gradiente ventro-dorsal se ocuparía el gen *dorsal*, en tanto que el *bicoid*, materno, determinaría el desarrollo de la cabeza y el *nanos*, la región caudal. Los genes *gap* se encargarían de los segmentos torácicos y abdominales de *Drosophila*. Terminada la segmentación, tres grandes complejos génicos, el *antennapedia*, el *bithorax* y el *ultrabithorax* serían los responsables del destino último de los segmentos.



EDWARD B. LEWIS

En 1983, Kary Mullis concibe la reacción en cadena de la polimerasa. En 1984 es la observación del fenómeno de la impronta según el cual ciertos genes poseen sólo un alelo funcional en algunos tejidos; la otra copia del gen, aunque presente, está inactiva. La impronta explicaría la presencia de ciertas malformaciones congénitas y algunos tipos de cáncer. Todo ello recibió un salto espectacular gracias a la identificación de los genes del desarrollo y sus patrones de activación espacio-temporal anteriormente mencionados.

El fenómeno de la senescencia celular es descubierto en 1961 por Hayflick y Moorhead al demostrar la presencia de un contador de divisiones en los fibroblastos humanos cultivados los cuales mueren tras un número finito de divisiones, a pesar de mantenerse bajo condiciones adecuadas. El llamado límite de Hayflick o capacidad limitada de división de las células normales es explicado por Alexy Olovnikov, por el acortamiento de los telómeros. En 1986 Bob Horwitz llama la atención sobre un proceso de suicidio celular, la apoptosis, al estudiar el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*. El mecanismo celular no empezó a aclararse hasta siete años más tarde, cuando el mismo Horwitz describe que uno de los genes esenciales para el inicio de la apoptosis en el desarrollo de este nematodo, se traducía a una caspasa. A finales del milenio, en el 2000, se confirmó que las caspasas ponían en marcha una cascada proteolítica que era el germen del proceso de apoptosis. Ya se conocía que este proceso de suicidio celular era esencial para el desarrollo de los metazoos y la homeostasis de los tejidos.

Es evidente que la Biología Celular y la Embriología se han beneficiado, principalmente en las últimas décadas, de técnicas desarrolladas y perfeccionadas por otras disciplinas afines, fundamentalmente la Bioquímica y la Biología Molecular, como la cromatografía, la electroforesis en gel, el marcado isotópico, el análisis por difracción de rayos X, el fraccionamiento celular, la ultracentrifugación, y la citometría de flujo, que han contribuido notablemente al estudio de la composición molecular y del metabolismo celular, permitiendo relacionar la estructura de la célula con su arquitectura molecular y enfocar ambas de cara a sus funciones biológicas. El conjunto de todas estas técnicas ha posibilitado que el estudio de la célula y el origen del organismo saltase de su concepción clásica que se restringía a estudiar los constituyentes celulares y a la descripción morfológica de las tipos celulares y tejidos a una concepción mucho más moderna.

En conclusión, la evolución de los métodos de investigación, y los resultados obtenidos han ido cambiando la forma de entender la formación y evolución de los seres vivos. Tradicionalmente la Embriología tuvo un origen como una ciencia descriptiva que enumeraba los caracteres estructurales, posteriormente paso por etapas comparativa al comparar las estructuras de las diferentes especies y la Embriología moderna es cada vez mas una ciencia morfo-fisiológica que utiliza nuevos métodos de trabajo aportados por el progreso de las ciencias.