

CAPÍTULO 9.

CICLO CELULAR

La facultad de reproducción es una característica fundamental de todos los seres vivos. Las células eucarióticas se reproducen duplicando primero su contenido y luego se dividen en dos células hijas. La división celular es fundamental para la propagación de los organismos vivos. Cuando se divide un organismo unicelular origina dos células hijas o sea dos organismos. Los organismos multicelulares se originan a partir de innumerables divisiones del cigoto durante la embriogénesis y el crecimiento del organismo. En los adultos, las divisiones celulares se presentan en los tejidos que tienen una renovación contante de sus células. La importancia de este fenómeno se puede demostrar considerando, por ejemplo, el proceso de renovación de los glóbulos rojos (GR). Un ser humano adulto tiene en promedio $2,5 \cdot 10^{13}$ GR dentro de 5 litros de sangre, o sea en promedio $5 \cdot 10^6$ GR por mm^3 de sangre. Cada GR tiene un promedio de vida de 120 días, o sea $\pm 10^7$ segundos. Para mantener la población de GR estable, el organismo debe producir 2,5 millones de GR por segundo ($2,5 \cdot 10^{13}$ GR/ 10^7). Además, las divisiones celulares tienen que tener un control estricto para compensar exactamente las pérdidas.

El **ciclo celular** puede ser definido como el conjunto de procesos que culminan con la repartición igual del material de una célula en dos células hijas, generalmente idénticas. Se denomina **mitosis** a los procesos que reparten en dos células hijas el contenido de una célula, e **interfase** al período entre dos mitosis. El contenido de la célula, incluido su genoma, se duplica durante la interfase antes de cada mitosis.

En este capítulo se describe el ciclo celular y los mecanismos de su control. En el siguiente capítulo se describirá la división celular no controlada que genera tumores benignos y malignos o cáncer.

9.1. CICLO CELULAR

El ciclo celular se divide en dos partes fundamentales: la **interfase** y la **mitosis**. Generalmente la fase de mitosis o **fase M** se lleva a cabo entre una o dos horas, mientras que la interfase dura al menos 20 horas. Durante la interfase el ADN se encuentra en su forma de cromatina en el núcleo, no se pueden distinguir individualmente los cromosomas al MO ni al ME (Fig. 9.1). Durante la interfase ocurren dos procesos importantes: los **procesos continuos** como la síntesis de moléculas que intervienen en el mantenimiento y crecimiento celular (moléculas y organelos como ribosomas membranas, mitocondrias, RE, etc.); y los **procesos discontinuos** sólo ocurren una vez por cada ciclo celular, como la síntesis del ADN, la duplicación del centriolo y la síntesis de histonas. La síntesis del ADN se realiza únicamente durante una fracción de la interfase denominada la **fase S**, precisamente por la síntesis del ADN que duplica el genoma de la célula. El período comprendido entre la finalización de la fase M y el inicio de la fase S se denomina **fase G1** (*Gap* del inglés, porque no se sintetiza ADN) donde se realizan los procesos continuos, y la célula tiene una gran actividad metabólica y de transcripción. Existe siempre una etapa entre la culminación de la duplicación total de genoma y el inicio de la siguiente mitosis denominada **fase G2**, donde los procesos continuos preparan a la célula para entrar en la fase M. El ciclo celular cubre entonces el conjunto de eventos que lleva a la división de una célula en dos células hijas componiéndose de las cuatro fases mencionadas: fase G1, fase S, fase G2 y fase M. El tiempo promedio de cada una de las fases en las células cultivadas, es de 9, 10, 2 y 1 hora respectivamente.

La fase G1 presenta el lapso de tiempo más variable, incluso en el seno de una población celular homogénea en proliferación. Es también, la fase en la cual se quedan generalmente las células que no se dividen más o se diferencian como las neuronas. En esos casos se habla de un bloqueo del ciclo celular en la fase G1. Para algunos autores no es un simple freno del ciclo celular, sino que la célula sale del ciclo y entra en una fase distinta denominada G0, o retirada del ciclo celular porque la célula se diferencia funcionalmente dentro del tejido u órgano donde se localiza. El tránsito por esta fase G0 sería reversible y las células podrían entrar de nuevo a la fase G1 si se estimula adecuadamente su multiplicación.

El tiempo en que las células permanecen en G0 o G1 bloqueado varía enormemente en los organismos multicelulares. Las neuronas y el músculo esquelético no se dividen, los hepatocitos se dividen una vez cada año o cada dos años, las del epitelio intestinal pueden dividirse dos veces por día. El número de divisiones en un tiempo determinado dependen de las necesidades del tejido en el organismo. La tasa de divisiones celulares varía según las circunstancias externas y a las características funcionales del tejido dentro del organismo. Por ejemplo, si el hígado sufre un daño severo, los hepatocitos sobrevivientes se dividen hasta dos veces por día para regenerar el órgano.

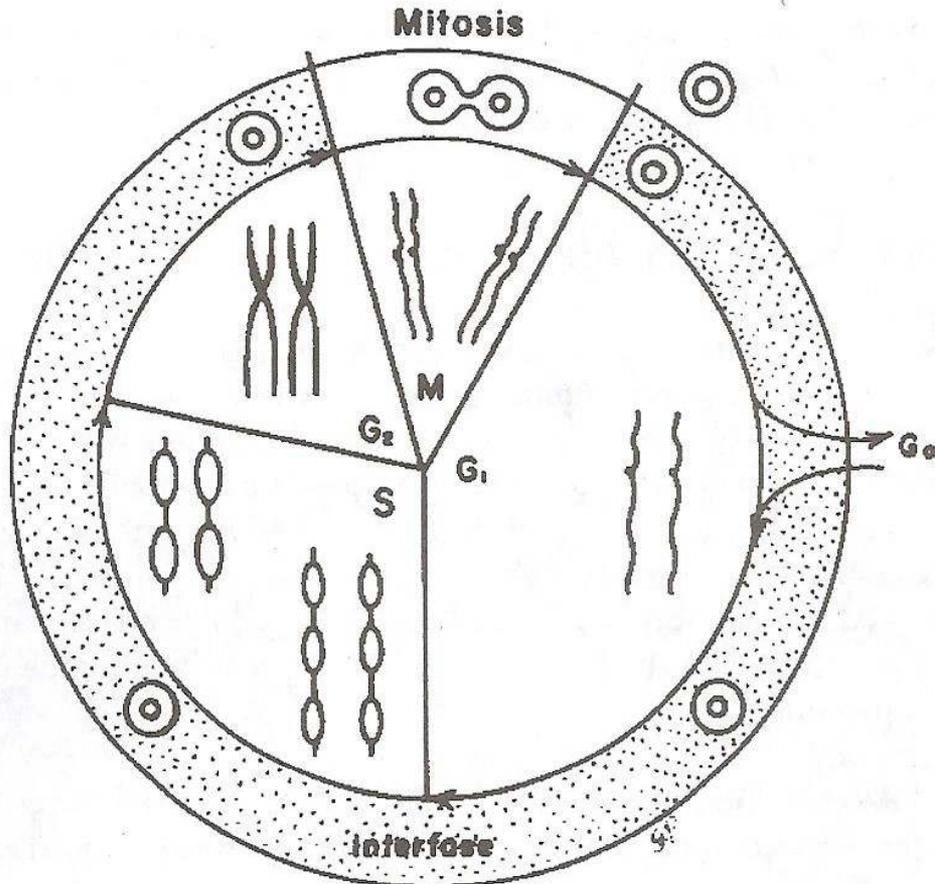


Figura 9.1. Esquema del ciclo celular.

En las observaciones al MO y ME, el ciclo celular se divide en mitosis e interfase. Molecularmente la interfase se divide en tres: la fase G₁, la fase S o síntesis del ADN y la fase G₂. El esquema representa el ADN de un par de cromosomas en las diferentes fases del ciclo celular para visualizar las diferencias a nivel molecular del contenido de ADN. Los cromosomas se segregan durante la fase M o mitosis.

El bloqueo en G₁ o salida del ciclo celular durante un tiempo indeterminado se denomina fase G₀. En general, en esta fase la célula se diferencia funcionalmente.

G₁: fase G₁; S: fase S; G₂: fase G₂; M: fase de mitosis y división celular; G₀: quiescencia o salida del ciclo celular.

La descripción del ciclo celular que se hizo debe considerarse como general. El ciclo celular puede variar según las especies y los diferentes tipos celulares. Por ejemplo, al inicio de la embriogénesis el cigoto se divide muy rápidamente y los ciclos celulares son más cortos: duran aproximadamente 30 minutos y se conforman principalmente de fase S y M. La célula gigante que es el huevo se divide en muchas células pequeñas lo más rápidamente posible. De todos modos debe duplicar su ADN durante cada ciclo celular. Todas las moléculas necesarias para la síntesis de proteínas, de ARN y del ADN se encuentran ya en el gran citoplasma de los oocitos que se ha formado durante su maduración antes de ser fecundados por el espermatozoide.

De otra parte, es posible que las células se bloqueen en su ciclo natural también fuera de la fase G1. Algunos antimitóticos que se utilizan en el tratamiento del cáncer bloquean las células en la fase S y otros en la fase M.

9.2. DUPLICACION DEL ADN

El ADN no solamente sirve de molde para la síntesis de diferentes clases de ARN sino también para que se sintetice una copia exacta de sí mismo. La síntesis de la copia total del ADN o genoma de una célula se denomina la duplicación del ADN (*replication*) que se realiza antes de cada mitosis a través de la fase S del ciclo celular. La duplicación, como la transcripción del ADN, también necesita la descondensación de la cromatina en fibras de 10 a 11 nm de diámetro. Durante su duplicación el ADN debe abrirse en dos a lo largo de su doble hélice como ocurre durante su transcripción y deben sintetizarse dos nuevas hebras complementarias sobre las dos parentales.

En las células eucarióticas la síntesis del ADN de la cromatina de un cromosoma no se inicia en un solo punto como en las bacterias y las mitocondrias, sino en varios puntos diferentes debido probablemente a su tamaño relativamente largo. Cada punto de origen de la duplicación (Fig. 9.2 PO) crea dos horquillas o teneadores de duplicación. En el punto de origen de duplicación, primero las dos hebras del ADN bicatenario se separan y luego se sintetiza progresivamente una hebra complementaria sobre cada hebra parental separada (ADN molde o ADN templado). La síntesis del ADN progresa en dos direcciones en cada horquilla de duplicación a partir del punto de origen, es decir que sobre una de las hebras se sintetiza de forma continua a partir del punto de origen hacia la bifurcación de la horquilla (de 3' a 5' del ADN molde), mientras que sobre la otra hebra la síntesis se realiza en forma discontinua, por pequeños fragmentos, desde la bifurcación de la horquilla hacia el punto de origen (siempre de 3' a 5' del ADN molde) (Fig. 9.3 A).

Las **helicadas** separan las dos hebras en el punto de origen de la duplicación y continúan separando el ADN en las dos horquillas de duplicación rompiendo los puentes de hidrógenos entre los nucleótidos antiparalelos de la fibra de ADN (Fig. 9.2 Helicada, H). Para la síntesis de las dos hebras complementarias es necesario desenrollar progresivamente la fibra del ADN parental y evitar un superenrollamiento o supertorsión. Las **girasas II** en eucariotes (topoisomerasas en procariotes) desenrollan cada fibra de ADN parental adelante de los puntos de bifurcación de las horquillas de duplicación (Fig. 9.2 Girasa, G), permitiendo el giro de cada fibra sobre su propio eje, así se evita la ruptura del ADN y se posibilita el progreso de la síntesis.

La síntesis de las hebras continuas es iniciada por las **primasas** (Fig. 9.2 Primasa, P) que sintetizan un ARN complementario al ADN molde de unos 30 nucleótidos, denominado cebador o *primer* (Fig. 9.2 ARN cebador, línea negra gruesa). El ARN cebador es indispensable para que las ADNpolimerasas (α y β en eucariotes, I, II y III en procariotes) puedan iniciar la síntesis de la nueva hebra complementaria a la molde (Fig. 9.2 2 ADNpoli).

La duplicación del ADN a partir de cada punto de origen tiene una característica de asimetría que se debe a dos hechos biológicos: primero, las dos hebras de la doble hélice del ADN son antiparalelas; y segundo, las **ADN polimerasas** α y β (ADNpoli) sintetizan la nueva hebra de ADN sólo en una dirección, del extremo 5' al 3'. Entonces el mecanismo de síntesis de cada nueva hebra no es el mismo hacia las dos direcciones: las dos nuevas hebras que empiezan su síntesis cuya dirección va de 5' a 3' pueden ser sintetizadas de manera continua (Figs. 9.2. Hebra continua; Fig. 9.3. Hebra continua), mientras que las otras dos hebras tendrían que sintetizarse en dirección 3' a 5', lo cual no es posible. Esta dificultad fue solucionada después de muchas investigaciones y teorías contradictorias, por el investigador japonés Okasaki. Efectivamente, esas dos hebras retrasadas se sintetizan también en la misma dirección 5' a 3' como las hebras continuas pero por pequeños fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases denominados fragmentos de Okasaki (Fig. 9.2 FO₁, FO₂, Fig. 9.3 Hebra retrasada).

A medida que prosigue la síntesis de las hebras continuas por las ADNpoli; sobre las hebras moldes retrasadas no duplicadas se unen **proteínas desestabilizadoras** del ADN (Fig. 9.2 PD) para impedir la formación de repliegues y bucles que impedirían la acción de la primasa y de la ADNpoli.

Cuando la hebra retrasada tiene aproximadamente 200 pares de bases libres se comienza la síntesis de los primeros fragmentos de Okasaki. Las primasas sintetizan los ARN cebadores (Fig. 9.2 línea negra gruesa de FO₁) y la ADNpoli continúa la síntesis del fragmento de Okasaki hasta encontrar el ADN ya duplicado (Fig. 9.2 líneas paralelas de FO₁) de la hebra continua. Este proceso se repite a medida que progresan las horquillas de duplicación (Fig. 9.2 FO₂). Las proteínas desestabilizadoras son liberadas a medida que pasa la primasa o la ADNpoli.

Otras moléculas de ADNpoli (Fig. 9.2 2 *) eliminan el ARN cebador de la hebra continua y lo reemplazan por ADN (Fig. 9.2 2 ADN*). Las uniones fosfodiéster que faltan entre el punto de origen y el fragmento de Okasaki (Fig. 9.2 PO y L), es decir entre el ADN que reemplazó el ARN cebador de la hebra continua y el ADN duplicado del fragmento de Okasaki son realizadas por las **ligasas** (Fig. 9.2 Ligasa, L). Estas enzimas ligan completamente las hebras neosintetizadas donde sea necesario realizar las uniones fosfodiéster, por ejemplo, de los fragmentos de Okasaki. La horquilla de duplicación culmina cuando se encuentra con la horquilla vecina.

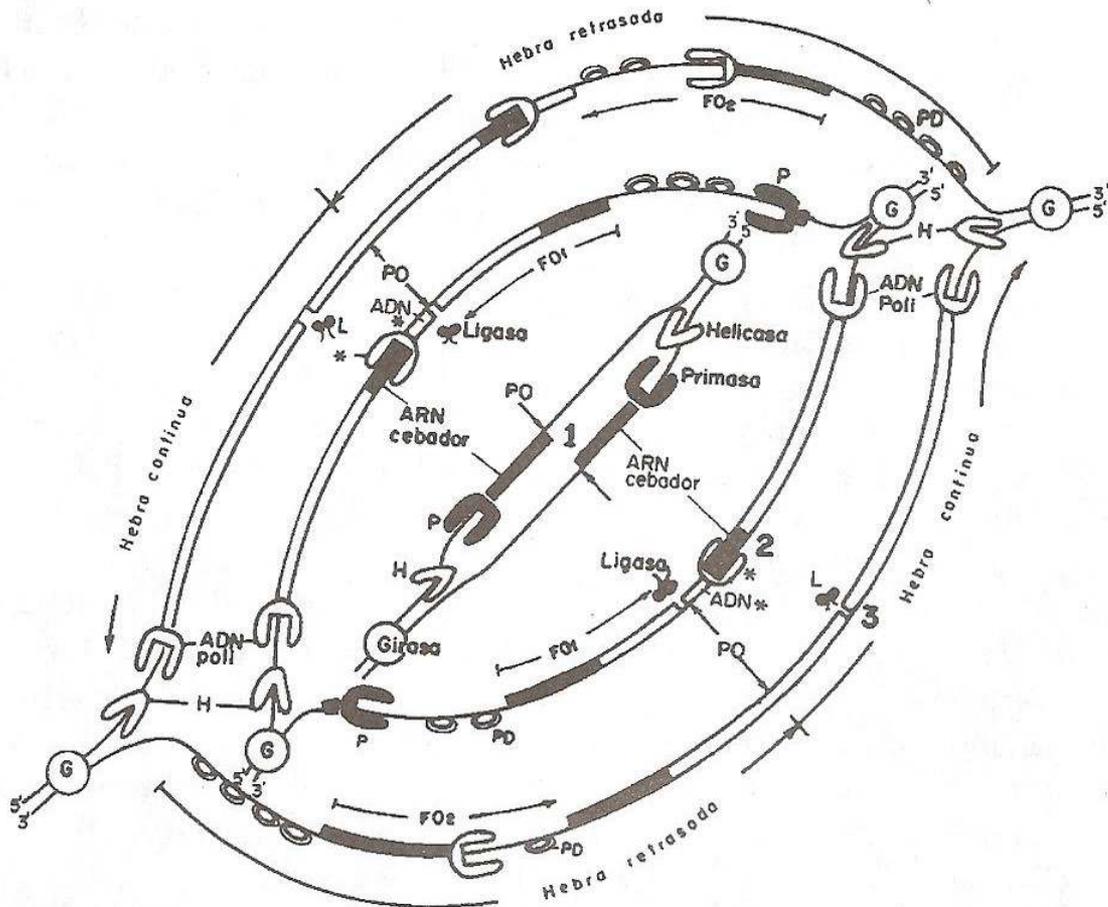


Figura 9.2. Esquema de la síntesis del ADN en dos horquillas de duplicación a partir del punto de origen.

1. Las helicasas (H) abren la fibra de ADN a partir del punto de origen (PO), lo continúan haciendo hasta que se culmine la duplicación del ADN de cada horquilla. Las girasas II (G) desenrollan la fibra de ADN. La primasa (P) sintetiza el ARN cebador (línea gruesa negra) de las hebras continuas.
2. A partir del ARN cebador, las ADN polimerasas (ADNpoli) sintetizan las hebras continuas hasta que se culmine la duplicación del ADN de cada horquilla. Las proteínas desestabilizadoras (PD) se colocan sobre la hebra retrasada y no duplicada. Las dos horquillas de duplicación progresan. El primer fragmento de Okasaki ha sido sintetizado (FO_1) en las dos hebras retrasadas, una primasa ha sintetizado el ARN cebador (línea gruesa negra de FO_1) y a partir del ARN cebador una ADNpolimerasa ha culminado la síntesis del ADN del primer fragmento de Okasaki (líneas paralelas de FO_1). Las ADNpoli (*) reemplazan el ARN cebador de las hebras continuas por ADN (ADN^*) y las ligasas (L) unen los ADN duplicados de las hebras continuas y del primer fragmento de Okasaki. La primasa (P) se coloca sobre el ADN no duplicado de cada hebra retrasada para iniciar la síntesis del ARN cebador del segundo fragmento de Okasaki.
3. Mientras progresan las horquillas de duplicación se sintetizan nuevos fragmento de Okasaki (FO_2). De nuevo, otras ADNpoli inician la síntesis del ADN del segundo fragmento de Okasaki (FO_2) a partir de los ARN cebadores (línea gruesa negra de FO_2). Otra ADNpoli reemplaza el ARN cebador del primer fragmento de Okasaki por ADN en las dos hebras retrasadas. Las ligasas (L) unen los ADN duplicados de la región del ARN cebador de la hebra continua que ha sido reemplazada por ADN y del ADN duplicado de la hebra continua. Las proteínas desestabilizadoras (PD) se colocan sobre la hebra retrasada no duplicada, lo continúan haciendo hasta que se culmina la duplicación del ADN de cada horquilla.

A nivel molecular, los procesos de duplicación del ADN son esencialmente los mismos en los procariotes y los eucariotes. Pero la velocidad de duplicación del ADN en las células humanas es 50 veces más lenta que en las bacterias. La velocidad de duplicación del ADN en las células humanas en cultivo es del orden de 0,5 μm por minuto, o sea 50 nucleótidos por segundo. La diferencia en la velocidad de la síntesis del ADN se explica por la existencia de nucleosomas en eucariotes que no presentan los procarióticos, y por las fibras de ADN más largas en eucariotes. Los complejos nucleo-histónicos en los eucarióticos determina una velocidad más lenta de la duplicación del ADN comparada con la de los procarióticos. Además el tamaño más grande de las fibras de cromatinas de cada cromosoma eucariótico debe generar una tensión más grande de torsión delante de las horquillas de duplicación y así disminuyendo la velocidad de la duplicación (Fig. 9.3 A). El ADN procariótico es circular y presenta un solo punto de origen de duplicación. En el ser humano, se estima que un cromosoma está compuesto por un filamento de ADN que sería de 5 cm de longitud si se descondensara completamente, o sea 150 millones de nucleótidos, un solo cromosoma representa 50 veces más el genoma de una célula procariótica. Para que la fase S se desarrolle en tan solo una decena de horas, cada cromosoma necesitaría simultáneamente 80 a 100 puntos de origen de duplicación. Efectivamente, por el método de autorradiografía se demostró que se forman y coexisten muchas horquillas de duplicación a lo largo de un mismo cromosoma.

De otra parte, la síntesis de una horquilla de duplicación dura de 5 a 50 minutos, mientras que la fase S dura unas diez horas, lo que implica la existencia de un mecanismo que impide la reduplicación de fibras ya duplicadas. Se supone que inmediatamente después de la duplicación de un segmento de ADN, un complejo inhibitor se le une a este segmento inhibiendo su reduplicación.

Los complejos enzimáticos necesarios para la duplicación del ADN (ADN polimerasas, girasas, ligasas, etc) se sintetizan a lo largo de todo el ciclo celular, porque además de realizar la duplicación del ADN reparan el ADN durante la interfase. La síntesis de las nuevas histonas H_3 y H_4 comienza en general una hora antes del inicio de la fase S, coincidiendo con el punto de control G_1 del ciclo celular (Ver 9.4) y las otras histonas se sintetizan durante la fase S. Lo anterior demuestra que la célula puede transcribir aún durante la fase S e indica también que las histonas deben duplicar su cantidad durante un tiempo relativamente corto. Se ha comprobado que aproximadamente 400.000 moléculas de histonas son importadas al núcleo por minuto. Varios mecanismos aseguran que la célula pueda sintetizar grandes cantidades de histonas en corto tiempo. Este proceso es posible gracias a la amplificación de los genes de las histonas (Ver 8.3.2), a la no existencia de intrones en sus ARNs, y a la ausencia de la cola poliA en el extremo 3' de sus ARNm.

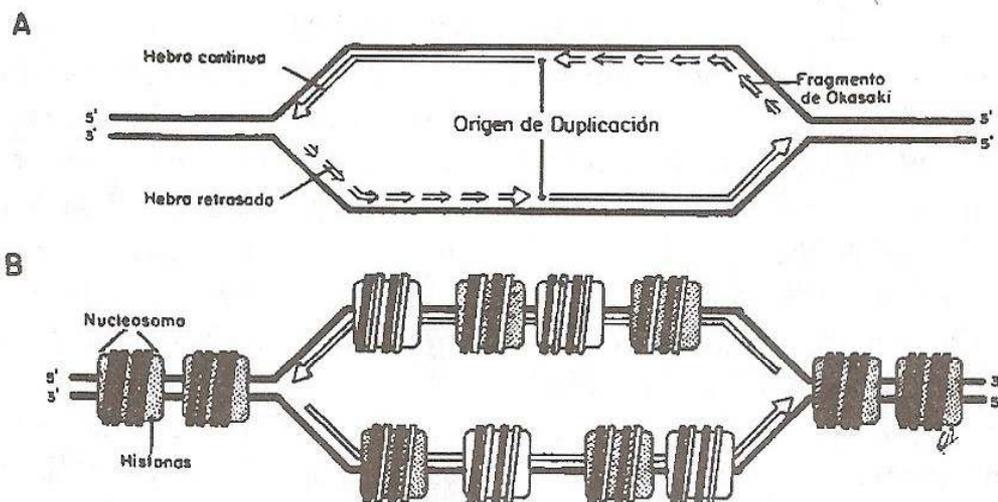


Figura 9.3. Horquillas de duplicación del ADN.

A. La síntesis de las hebras complementarias se realiza siempre en la dirección 5' a 3'. Cuando la hebra molde es copiada en su dirección 3' a 5' la síntesis es continua (hebras continuas) en dirección 5' a 3'. La síntesis de la hebra retrasada se hace por fragmentos de Okazaki.
 B. Esquema de las posibilidades de la repartición de los núcleos de nucleosomas "viejos" (en punteado) y rearrreglos de "nuevos" núcleos de nucleosomas (en blanco) durante la duplicación del ADN (Gruss y Col., 1990).

Durante la duplicación del ADN los nucleosomas se desorganizan y se reorganizan rápidamente, como ocurre durante la transcripción del ADN (Fig. 8.11). Pero en este caso debe duplicarse también el número de nucleosomas. A medida que se va duplicando la fibra de ADN, se van reformando los nucleosomas sobre las dos fibras duplicadas. Sobre una fibra se reorganiza el nucleosoma "viejo" y sobre la otra se le unen rápidamente los dímeros H₃-H₄ reformando el tetrámero y rápidamente se le unen las histonas H₂A y H₂B reformando un nuevo núcleo histónico (Fig. 9.3 B). Los octetos de los nucleosomas parcialmente desorganizados se reorganizan generalmente juntos y a partir de nuevas histonas se organizan nuevos octetos para formar nuevos nucleosomas. La distribución de los octetos de histonas nuevos y "viejos" en las fibras del ADN duplicado se realiza al azar.

No se conocen con precisión los factores que determinan los puntos de origen de duplicación. En las levaduras se ha descrito una región del ADN, denominado ORI (región de origen de duplicación), que determina el origen de duplicación. Esta región ORI contiene secuencias específicas de ADN a las cuales se unen proteínas específicas denominadas **proteínas de la duplicación** (Fig. 9.4). El ORI consiste en un núcleo ori y dos componentes auxiliares. El núcleo ori está compuesto por tres secuencias del ADN: primero, secuencias ricas en adenina-timina (Fig. 9.4 A/T); segundo, secuencias donde se unen proteínas que reconocen el punto de iniciación u origen de la duplicación (Fig. 9.3 ORE); y tercero, una secuencia de ADN desenrollado (Fig. 9.3 DUE) que coincide con el origen bidireccional de la duplicación del ADN. A las dos secuencias auxiliares del ORI

(Fig. 9.4 aux-1 y aux-2) se unen factores de transcripción (Fig. 9.4 FT) que intervienen en la desestabilización de los nucleosomas de la cromatina para la duplicación del ADN. En esta desestabilización, los factores de transcripción y las proteínas de reconocimiento del punto de origen interactúan en la región ORI y son consideradas las proteínas de la duplicación. Los dos tipos de proteínas reconocen la región ORI e intervienen en la apertura de la fibra del ADN y en la iniciación de las horquillas de duplicación permitiendo la ubicación correcta de las helicasas.

Se han encontrado regiones ORI en otros eucariotes, pero con variaciones, por ejemplo en el hombre no se ha encontrado la secuencia A/T y aunque existan proteínas que se unen al punto de iniciación se desconocen sus características.

Las proteínas de la duplicación unidas a las regiones ORI hacen posible que la primera helicasa se coloque adecuadamente y abra la fibra de ADN y que la primasa inicie la síntesis del ARN cebador de la hebra continua de la primera horquilla. Estas mismas proteínas participan también en la apertura realizada por la segunda helicasa en la otra dirección a partir del punto de origen. Así la primasa puede iniciar la síntesis del cebador de la otra hebra continua de la segunda horquilla de duplicación. Estos procesos ocurren en todos los puntos de iniciación de la duplicación del ADN.

Una vez finalizada la fase S, la célula pasa a la fase G₂, donde se hacen los preparativos para la condensación de los cromosomas antes de la iniciación de la mitosis. En esta fase se realiza una metilación masiva de las histonas sobre sus lisinas que estabiliza los cromosomas. Al final de la fase G₂ existe también el punto de control M del ciclo celular que determina eventualmente la iniciación de la mitosis (Ver 9.4).

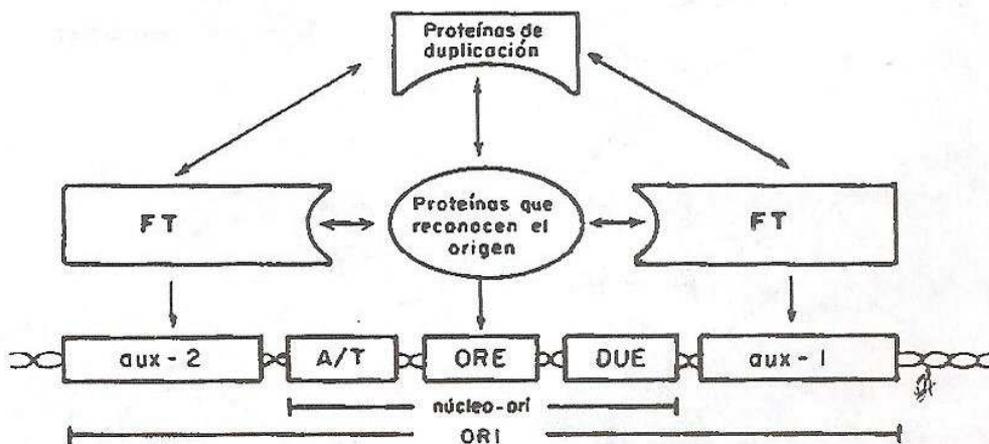


Figura 9.4. Secuencias de ADN que determinan la región del origen de la duplicación (ORI) en el ADN de las levaduras.

La ORI está compuesta por un núcleo *ori* que tiene tres secuencias consensos (*A/T*, *ORE* y *DUE*) y por dos secuencias auxiliares (*aux1* y *aux2*) en sus extremos. Las proteínas de reconocimiento del origen se unen a las tres secuencias del núcleo *ori* y los factores de transcripción (FT) se unen a las dos secuencias *aux*. Las dos clases de proteínas se denominan proteínas de la duplicación (De Pamphilis, 1990).

La duplicación del ADN mitocondrial se realiza durante todo el ciclo celular, el proceso es básicamente el mismo descrito para el ADN nuclear, pero tiene un solo punto de origen de duplicación, y su ADN polimerasa es diferente y se llama ADNpoli g. La división de las mitocondrias se hacen por fisión o segmentación cuando lo requiere la célula.

9.3. MITOSIS

La mitosis o fase M es el proceso por el cual las células eucarióticas segregan el genoma o ADN duplicado con anterioridad, de manera que cada una de las fibras duplicadas queden presentes en las dos células hijas. En general la mitosis dura una o dos horas. La figura 9.5 resume el conjunto de los procesos que ocurren en las diferentes fases de la mitosis.

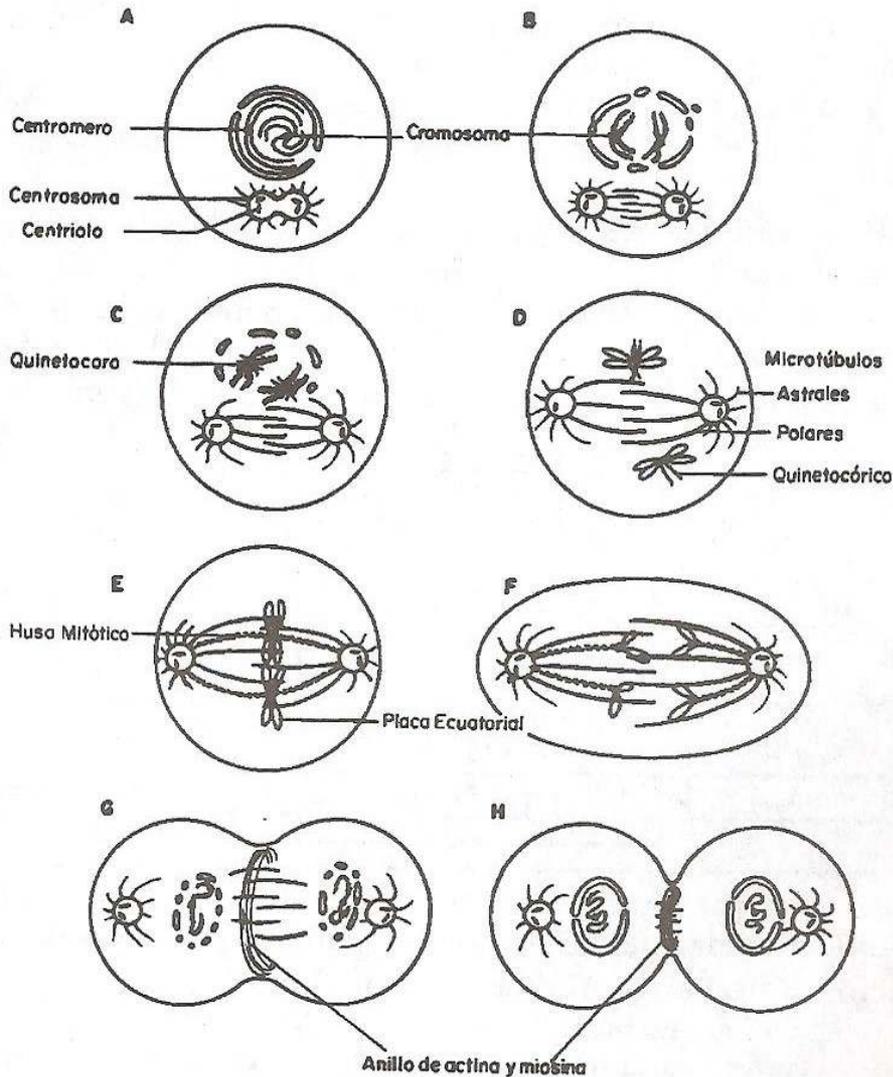


Figura 9.5. Esquema de las grandes etapas de la mitosis.

A, B, C y D: Profase; E: Metafase; F: Anafase; G y H: Telofase.

9.3.1. Las grandes etapas de la mitosis

Las fibras de cromatina dispersas en el nucleoplasma en interfase (fases G1, S y G2) se supercondensan durante la mitosis formando cuerpos visibles al microscopio óptico, llamados **cromosomas**. El nombre de cromosoma se debe a que son coloreados intensamente con los colorantes básicos y fue descrito antes de conocer la estructura del núcleo y de la cromatina.

Durante la **profase** las fibras ya duplicadas de cromatina que corresponden a cada cromosoma se condensan en cromosomas (Fig. 9.5 A, B, C y D). Se forma el huso mitótico, desaparecen el nucléolo y la envoltura nuclear. Los cromosomas condensados se van a alinear y formarán la placa ecuatorial.

En las células animales, el huso mitótico polar se desarrolla entre los centrosomas. Al inicio de la profase, el centrosoma acompañado de los microtúbulos astrales se divide en dos (Fig. 9.5 A), y comienza la formación de los microtúbulos polares del huso mitótico a partir de los dos centrosomas (Fig. 9.5 B). Al mismo tiempo que se divide el centrosoma, la lamina nuclear se desorganiza. Antes de su desorganización sus láminas A y C son fosforiladas y su lámina B es desfosforilada. La pérdida de la relación de la envoltura nuclear con la lámina nuclear induce su vesiculación. Finalmente toda la cromatina se condensa y forma los cromosomas (Fig. 9.5 C).

Las dos cromátides o fibras de la cromatina de ADN duplicado están unidas a nivel de una constricción denominada **centrómero**. A medida que se va condensando la cromatina se forma una masa proteica a nivel del centrómero de cada cromosoma denominada **quinetocoro**. Cada quinetocoro forma los microtúbulos quinetocóricos que relacionarán a los cromosomas con cada centrosoma. Durante la organización de los microtúbulos quinetocóricos con los polares, la actividad ATPásica de las proteínas motoras genera la energía necesaria para que los cromosomas se ubiquen en la placa ecuatorial de la célula (Fig. 9.5 D).

La **metafase** es una etapa muy corta caracterizada por la organización de todos los cromosomas a nivel de la placa ecuatorial con sus cromátides paralelas al ecuador de la célula (Fig. 9.5 E). El eje de los cromosomas está constituido por proteínas no histónicas formando dos estructuras lineales simétricas unidas por un punto, que corresponde a la región centromérica (Fig. 8.5. F). Los microtúbulos polares que parten de cada centrosoma se superponen a nivel de la placa ecuatorial. Los microtúbulos quinetocóricos se dirigen del centrómero de cada cromosoma hacia los centrosomas formando la estructura conocida como huso mitótico quinetocórico. El funcionamiento dinámico de esos microtúbulos para mover los cromosomas se describen en la sección 9.3.3.

La siguiente etapa es la **anafase** que se caracteriza por la segregación y la migración de los cromosomas hacia los centrosomas (Fig. 9.5 F). La separación de las dos cromátides de cada cromosoma metafásico origina dos cromosomas con una cromátide que migran hacia polos opuestos de la célula dirigidos por sus centrómeros.

Cuando los cromosomas segregados llegan a los centrosomas se inicia la **telofase** (Fig. 9.5 G y H). La envoltura nuclear se reforma alrededor de los cromosomas y se inicia la descondensación de los cromosomas perdiendo su individualidad al observarlos en el MO y el nucléolo reforma. La división mitótica se termina con la **citocinesis** o división de la célula que reparte el citoplasma entre las dos células hijas. La citocinesis se realiza principalmente por un anillo de actina y miosina que se forma a nivel del entrecruzamiento de los microtúbulos polares. Este anillo se estrecha progresivamente y divide la célula en dos células hijas (Ver 9.3.4).

La reorganización de la envoltura nuclear se realiza en tres etapas: primero, se unen vesículas alrededor de los cromosomas y se fusionan; segundo, la desfosforilación de las láminas A y C y la refosforilación de la lámina B reorganiza la lámina nuclear que estabiliza la envoltura nuclear; y tercero, los complejos de los poros nucleares se reensamblan. La unión de las vesículas formadas por la desorganización de la envoltura nuclear a la cromatina no requiere de ATP o de GTP. Se ha demostrado que proteínas trans-membranas de estas vesículas sirven de receptores para unirse a la cromatina. Pero se requiere de ATP y GTP para la fusión de membranas de vesículas entre ellas. Se piensa que la fusión de membranas de las vesículas es mediada por proteínas G como ocurre en la fusión de las vesículas con la membrana blanco (Ver 5.4.2.3 y Fig. 5.21).

9.3.2. Los cromosomas y el cariotipo

Los cromosomas metafásicos esparcidos y examinados en su totalidad al ME aparecen como filamentos apelotonados o enrollados de 300 nm, repartidos en dos cromátides (Fig. 8.5 D y F). El centrómero es la constricción de un cromosoma metafásico donde se localiza el quinetocoro. El centrómero mantiene juntas las dos copias duplicadas del cromosoma o cromátides. El quinetocoro tiene la función de unir los cromosomas al aparato mitótico y el movimiento normal de los cromosomas durante la mitosis. Actualmente se emplea los términos centrómero y quinetocoro como "sinónimos", pero molecularmente son estructuras diferentes. Al ME el quinetocoro se ve como una estructura en forma de disco implantado a cada lado de la región centromérica del ADN. Las proteínas del quinetocoro tiene un aspecto trilaminar: dos capas opacas a los electrones y una capa mediana más clara con muchos microtúbulos quinetocóricos perpendiculares al disco.

El ADN de un cromosoma funcional tiene tres secuencias de nucleótidos que son necesarias para su duplicación completa y su segregación correcta: 1. secuencias que determinan los puntos de origen de duplicación; 2. secuencias que determinan el centrómero donde se forman los quinetecoros que permiten la segregación correcta de cromosomas durante la mitosis; 3. secuencias teloméricas que permiten la duplicación completa del ADN de cada cromosoma. Las secuencias de los puntos de origen ya se han descrito. Las secuencias del ADN de los orígenes de la duplicación se ubican durante la interfase en la heterocromatina inmediatamente debajo de la lámina nuclear. Las secuencias que determinan el centrómero de cada cromosoma son secuencias específicas repetitivas que se unen a un complejo proteico quinetocórico durante la mitosis cuyo funcionamiento se describe en la siguiente sección. Las regiones centroméricas de cromosomas se ubican durante la interfase en la heterocromatina que rodea al nucléolo.

La tercera secuencia se encuentra en los dos extremos de cada cromosoma denominadas secuencias teloméricas cuyo ADN es altamente repetitivo, rico en guaninas y similar en todos los organismos eucarióticos. La importancia de esas secuencias es que permiten la duplicación completa del ADN en cada ciclo celular. Sin esas secuencias sería imposible la duplicación completa de las hebras retrasadas en los dos extremos de cada cromosoma, porque la primasa no alcanza a sintetizar el cebador correspondiente a los últimos nucleótidos. Para que el ADN de un cromosoma no se vaya acortando en cada ciclo celular, una enzima denominada **telomerasa** prolonga los extremos de los cromosomas. Las telomerasas reconocen secuencias de los extremos de los cromosomas y sintetizan las mismas regiones hasta cien veces repetidas, alargando la hebra. La longitud de las secuencias teloméricas está bajo el control génico y cada cepa de levadura tiene una longitud que lo caracteriza. Cuando el ADN no tiene estas secuencias teloméricas, la telomerasa sintetiza un ARN cebador sobre el cual sintetiza las secuencias teloméricas. Las secuencias teloméricas continuamente se alargan y se acortan, son secuencias muy irreverentes, pero confieren resistencia a los extremos de los cromosomas contra el daño. Las regiones teloméricas se localizan preferencialmente en la heterocromatina vecina a la lámina nuclear y representan el 10% del total de la heterocromatina de esta región durante la interfase.

Los cromosomas metafásicos tienen dos cromátides (Fig. 9.5 E), mientras que los anafásicos tienen una sola (Fig. 9.5 F). Cuando se fusiona una célula en mitosis con una célula en interfase los cromosomas de la célula en interfase se condensan. Si la célula en interfase estaba en fase G₁, se constata que sus cromosomas condensados tienen una sola cromátide, mientras que si estaba en fase G₂, se observan las dos cromátides. Cada cromátide de un cromosoma metafásico corresponde a una sola molécula de ADN o sea que este cromosoma está formado por sus dos fibras de nucleótidos duplicadas en la fase S. El modelo de condensación de la cromatina en cromosomas metafásicos ha sido descrito en el capítulo anterior (Fig. 8.5).

El **cariotipo** designa el conjunto de cromosomas de una célula. En las células humanas existe en total 46 cromosomas que incluye dos cromosomas sexuales (XX en la mujer y XY en el varón) y 22 pares de cromosomas llamados autosómicos. De los 46 cromosomas, 23 vienen del padre y son homólogos de los 23 que vienen de la madre. El número de cromosomas caracteriza a cada especie.

Un cariotipo humano puede ser obtenido, por ejemplo, del cultivo de los fibroblastos de la piel, de las células de la médula ósea o de las células blancas de la sangre. Los cultivos son primero enriquecidos en células mitóticas por exposición a un agente como la colchicina que bloquea las mitosis en metafase. Los cromosomas se dispersan sometiendo las células a un medio hipotónico y se examinan al MO donde son fotografiados. Finalmente son cortados de la foto, apareados y clasificados para determinar así el cariotipo.

La clasificación más simple de cromosomas toma como criterios la longitud de los brazos por la posición del centrómero. El centrómero divide cada cromosoma en un brazo corto denominado **p**, y un brazo largo denominado **q**. Los cromosomas son llamados mediocéntricos o metacéntricos cuando los brazos tienen casi la misma longitud. De la misma manera se distinguen los cromosomas acrocéntricos donde el brazo pequeño es muy corto (cromosomas 13, 14, 15, 21, 22 y el Y en el ser humano). Para facilitar la identificación de los cromosomas y de sus eventuales anomalías en un cariotipo se utilizan técnicas especiales de coloración que provocan la aparición de bandas características sobre las cromátides; éste es el proceso de bandeo de los cromosomas. La naturaleza exacta de las bandas se desconoce pero refleja una condensación más o menos pronunciada de un conjunto de genes, y no diferencias puntuales en la composición de las bases. Gracias a la utilización de técnicas de bandeo se han localizado muchos genes sobre los cromosomas humanos. El establecimiento del mapa de los genes sobre los cromosomas humanos tiene una importancia considerable para la detección de enfermedades hereditarias. Esta detección puede aún hacerse durante el embarazo en las células fetales. El líquido amniótico obtenido por punción contiene células provenientes del feto y su cultivo permite el establecimiento del cariotipo fetal.

9.3.2.1. Anomalías de los cromosomas

Las anomalías de los cromosomas pueden ser anomalías de número o denominadas también aneuploidías tales como las monosomías o trisomías. Éstas pueden afectar los cromosomas sexuales X o Y, o los cromosomas somáticos. En el ser

humano, entre las anomalías de número que afecta los cromosomas autosómicos, la más conocida es el mongolismo, que resulta de una trisomía 21; otras anomalías de número son las monosomías 18 o 21, y las trisomías 13 o 18. Las técnicas de bandeado de cromosomas han revelado varias docenas de nuevas anomalías cromosómicas congénitas. Estas anomalías se caracterizan por translocaciones, duplicaciones o deleciones de porciones de cromosomas. El mecanismo más frecuente es la translocación recíproca, en la cual segmentos de cromosomas son intercambiados entre cromosomas de pares diferentes, es decir entre los cromosomas no homólogos. Las translocaciones no inducen necesariamente anomalías de desarrollo, porque pueden ser balanceadas, es decir no afecta la expresiones de genes. Sin embargo, es importante detectar los individuos afectados con la translocación balanceada, pues son portadores de variaciones génicas no expresadas.

En la nomenclatura estandarizada, el cariotipo del varón normal es designado como 46, XY, y el de la mujer como 46, XX. El cariotipo de una mujer afectada de una trisomía 18 es abreviado como: 47, XX+18; una monosomía X con una deleción sobre el brazo corto del quinto cromosoma se anota: 45, X, 5p-. Una translocación entre el brazo largo del cromosoma 2 y el brazo corto del cromosoma 3 en un varón se describe: 46, XY, t (2q:3p).

Actualmente se pueden detectar por las técnicas de ADN recombinante a partir de una muestra muy pequeña de ADN de una persona o del feto, características muy específicas del ADN que permiten el reconocimiento de la paternidad, del criminal, o de muchas enfermedades genéticas. Las técnicas de ADN recombinante incluyen las sondas de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de los fragmentos de restricción (RFPL), los marcadores moleculares por ADN polimórfico aleatorio amplificado (RAPD) y determinación de huellas dactilares del ADN.

El objetivo actual de la comunidad científica mundial es la secuenciación total de genoma del ser humano y la localización exacta de todos sus genes. Diferentes centros de investigación en varios países están trabajando en colaboración desde el año 1989 para este fin. Esta investigación facilitará cada vez más la comprensión de los mecanismos genéticos normales y también la génesis de las enfermedades.

9.3.3. Aparato mitótico y su funcionamiento

Se entiende por aparato mitótico el conjunto de estructuras que intervienen en la mitosis: centrosomas, cromosomas, microtúbulos astrales, quinetocóricos y

polares del huso mitótico. Se trata de una entidad funcional que puede ser aislada a partir de células en mitosis. La organización más espectacular de los microtúbulos se observa durante la formación del aparato mitótico responsable de asegurar la segregación de los cromosomas duplicados anteriormente a la mitosis. La configuración del aparato mitótico es básicamente el mismo durante la mitosis y la meiosis.

En las células animales, el centrosoma que se localiza durante la interfase en la región perinuclear (Fig. 7.14), y es el encargado de la formación del huso mitótico. Dentro del ciclo celular los dos centriolos de un centrosoma exhiben un ciclo particular de reproducción. La duplicación de los centriolos se inicia en la fase G1 y se culmina en la fase G2 antes de la división del centrosoma (Fig. 9.6). Los centriolos poseen un modo particular de duplicación, probablemente al origen de la orientación perpendicular característica de los dos centriolos. Los dos centriolos se separan al final de la fase G1 y empiezan a formar cada uno un procentriolo (Fig. 9.6 B). Los procentriolos se desarrollan cerca de la extremidad abierta de cada centriolo y perpendicularmente a la pared de los centriolos. El procentriolo crece progresivamente durante la fase S y culmina su formación al inicio de la fase G2. El centrosoma se divide en dos al inicio de la profase de la mitosis, cada uno con dos centriolos migran en sentidos opuestos determinando los dos polos del huso mitótico en la célula. Cuando se divide el centrosoma, cada uno se queda con un centriolo paterno y uno neoformado.

Una de las primeras manifestaciones de la profase es la división del centrosoma y la migración de cada nuevo centrosoma a los polos opuestos. Durante estos eventos los microtúbulos cambian rápidamente, los microtúbulos lábiles de interfase se acortan formando los microtúbulos astrales y otros inician su formación a partir de cada centrosoma y crecen quedando superpuestos o intercalados en sus extremos *plus*. Estos microtúbulos forman los microtúbulos polares. Los microtúbulos polares que se originan de centrosomas diferentes tienen una polaridad opuesta que genera las fuerzas que repulsan cada vez más los centrosomas a polos opuestos (Fig. 9.7 A). El distanciamiento de los dos centrosomas resulta del crecimiento de los microtúbulos polares que se alargan por adiciones de monómeros de tubulina en el extremo *plus*, es decir a distancia del centrosoma. El inicio de la formación del huso mitótico confiere una polaridad bien determinada y establece desde este momento el lugar donde los cromosomas se colocarán. El inicio de la formación del huso mitótico coincide más o menos con la desaparición de la envoltura nuclear.

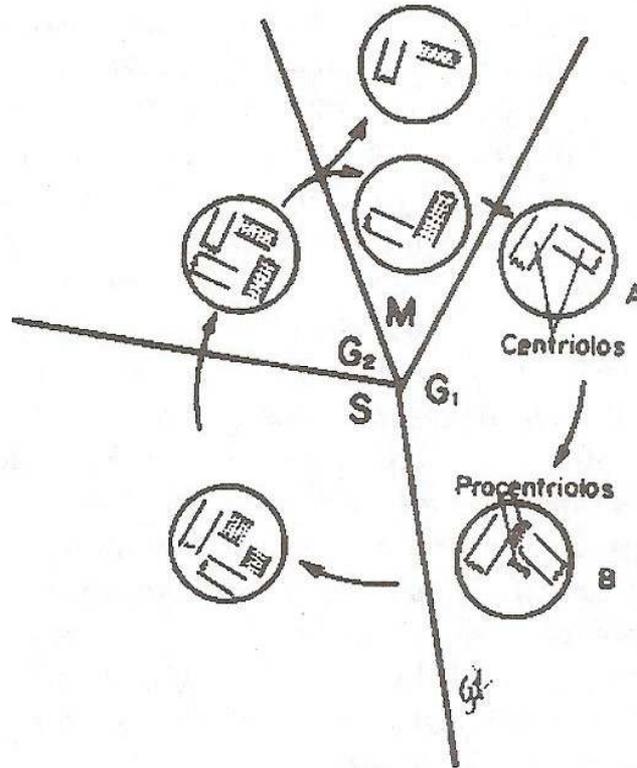


Figura 9.6. Esquema del ciclo de los centriolos de un centrosoma.

La síntesis de nuevos centriolos o procentriolos empieza al final de la fase G₁ (B) y se culmina al inicio de la fase G₂. El centrosoma se divide en dos al inicio de la profase de la mitosis. Cada nuevo centrosoma contiene un centriolo paterno y uno neoformado.

No se muestran los microtúbulos que están siempre relacionados con los centrosomas.

A: centriolo de una célula en reposo o G₀; B: centrosoma de una célula que inicia un nuevo ciclo celular; G₁: fase G₁; S: fase S; G₂: fase G₂; M: fase de mitosis.

Los microtúbulos quinetocóricos o del cromosoma se forman a partir de los dos quinetocoros de cada cromosoma, con una orientación bipolar también, el extremo *minus* del microtúbulo es alojado en el quinetocoro y el extremo *plus* a distancia del quinetocoro. Estos microtúbulos se comportan inicialmente como exploradores y entran en relación con proteínas motoras de los microtúbulos polares. A partir de esta interacción, los microtúbulos quinetocóricos se orientan hacia los dos centrosomas y crecen al mismo tiempo que los microtúbulos polares (Fig. 9.7 A). Estas interacciones favorecen la orientación paralela de los microtúbulos quinetocóricos con respecto a los microtúbulos polares, entremezclándose los unos con los otros con polaridades opuestas. Como resultado de todo lo anterior se forma el aparato mitótico con la polaridad opuesta tanto entre los microtúbulos polares de un centrosoma con respecto a los del otro centrosoma, y como también entre los microtúbulos quinetocóricos que van desde cada centrómero hasta cada centrosoma, y entre los quinetocóricos y polares. Los microtúbulos astrales interactúan con la superficie celular y ayudan a la orienta-

ción y estabilización del aparato mitótico. La máxima organización del aparato mitótico se observa en la metafase (Fig. 9.7 B). La superposición y engranaje de los microtúbulos polares en el plano ecuatorial es reforzada por proteínas que los estabilizan e impiden su polimerización. En el plano de la placa ecuatorial se ubican los cromosomas paralelamente y sus microtúbulos quinetocóricos paralelos a los polares culminan su crecimiento por polimerización alcanzando a los centrosomas de cada polo. Los microtúbulos polares no entran en contacto directo con los cromosomas, pero los extremos *plus* originados de cada centrosoma se superponen y se engranan a nivel ecuatorial. Los cromosomas ubicados en la placa ecuatorial son sometidos en sus centrómeros a fuerzas opuestas generadas por el huso mitótico que mantiene bajo tensión las dos cromátides de cada cromosoma. Efectivamente, un mecanismo molecular controla el desencadenamiento de la segregación de cromátides y sus movimientos respectivos hacia los centrosomas de los polos opuestos. Este mecanismo de desencadenamiento se denomina también el punto de control metafásico del ciclo celular que se estudia en la sección 9.4.

Los movimientos anafásicos de los cromosomas hacen intervenir dos mecanismos: de una parte, los microtúbulos quinetocóricos se acortan despolimerizándose por el extremo *minus* dentro del quinetocoro así acercan los centrosomas a los centrosomas, y de otra parte, los polos del huso se alejan. La elongación del huso se acompaña a menudo de una elongación celular. La importancia de estos dos mecanismos varía según las células. En los movimientos que conducen a los cromosomas a la posición ecuatorial metafásica y en los movimientos de separación y migración de los cromosomas en la anafase, los quinetocoros de los centrómeros son los elementos determinantes. La cromátide separada de cada cromosoma sigue pasivamente el movimiento de su centrómero respectivo. Cuando los cromosomas llegan al centrosoma de cada polo se inicia la telofase donde la envoltura nuclear se reorganiza alrededor de los cromosomas y los microtúbulos polares se despolimerizan, dejando únicamente sin despolimerización sus regiones ubicadas en la placa ecuatorial (Fig. 9.7 C). El entrecruzamiento de los microtúbulos polares de la placa ecuatorial de la metafase indica la ubicación a nivel de la membrana plasmática donde se formará el anillo actino-miosina de la telofase que intervendrá en la citocinesis o división de la célula. Hacia al final de la telofase empiezan a reformarse los microtúbulos lábiles a partir del centrosoma en las futuras células hijas.

Hay que mencionar que la corteza formada por los filamentos de actina de la interfase se desorganiza en la profase y vuelve a reorganizarse en las dos células hijas.

Los mecanismos moleculares del funcionamiento del aparato mitótico son poco conocidos. Se admite que son de dos tipos. Para el alejamiento de los dos polos, las proteínas motoras quinesinas con actividad ATPásica provocan un "deslizamiento" de microtúbulos polares que están engranados a nivel ecuatorial. Para la migración de los cromosomas, la despolimerización de los microtúbulos

quinetocóricos es el elemento importante, pero las proteínas motoras dineínas relacionan los microtúbulos polares y quinetocóricos cerca de los centrosomas para dar más estabilidad a los microtúbulos quinetocóricos y una correcta migración de los cromosomas hacia los centrosomas (Fig. 9.7 B).

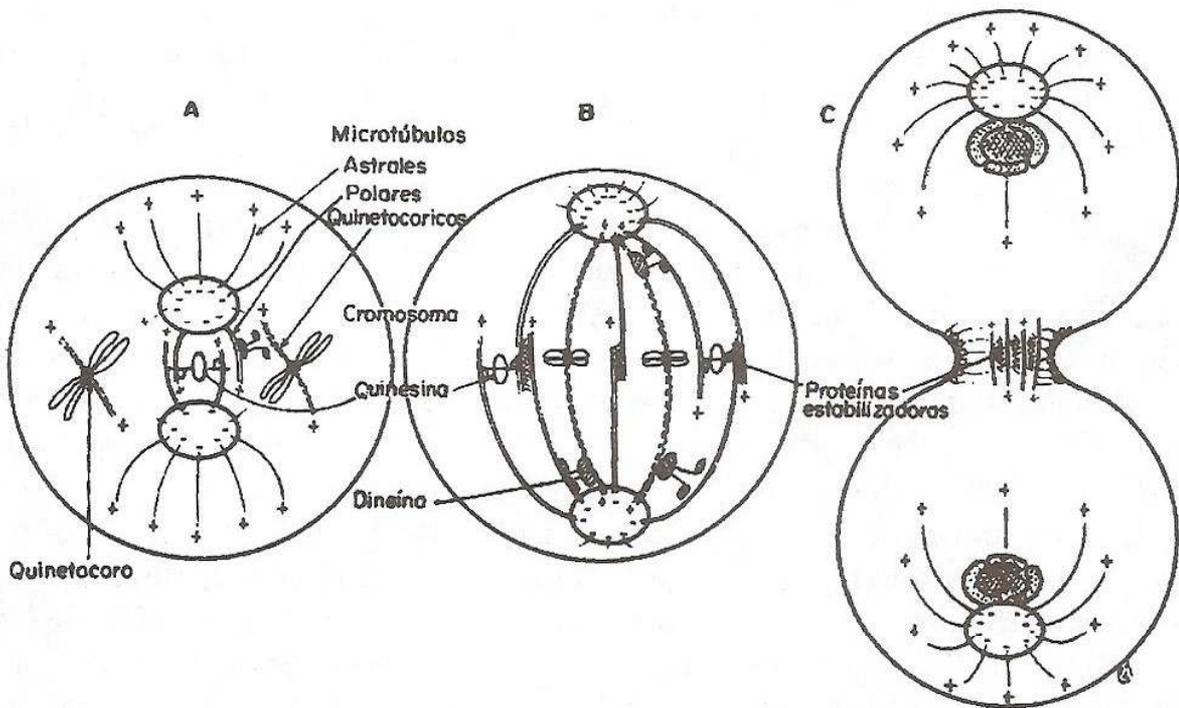


Figura 9.7. Organización del aparato mitótico.

A. Durante la profase la cromatina se condensa en cromosomas, se separan los centrosomas y comienza la formación de microtúbulos polares y quinetocóricos del aparato mitótico.

B. En la metafase los cromosomas son alineados en la placa ecuatorial y unidos por sus microtúbulos quinetocóricos a los dos centrosomas. A nivel de la placa ecuatorial los microtúbulos polares intercalados son relacionados por las proteínas estabilizadoras. Las proteínas motoras de los microtúbulos como dineínas y quinesinas regulan la orientación y ubicación adecuada de los microtúbulos polares y quinetocóricos.

C. En telofase los microtúbulos del huso mitótico se despolimerizan progresivamente, y los microtúbulos se reorganizan en los microtúbulos lábiles de la interfase. A nivel de la placa ecuatorial el anillo actinmiosina forma el surco de la citocinesis.

Al inicio de profase, las proteínas motoras dineínas entran en relación con los microtúbulos polares en formación, los orienta y colabora con la separación de los centrosomas. Otras proteínas motoras (la familia BimC) cooperan con las dineínas en el inicio de la formación del huso mitótico. Las proteínas motoras quinesinas intervienen en la zona donde se intercalan los microtúbulos polares para mante-

ner estos microtúbulos antiparalelos y orientar los extremos *plus* (Fig. 9.7 A). Para contrarrestar las fuerzas opuestas generadas durante este movimiento de centrosomas y la formación de los microtúbulos polares intervienen otras proteínas motoras (p50 dinamitina y las dinactinas) que controlan el movimiento del aparato mitótico en formación. Los polos del huso mitótico están definidos por los centrosomas donde el anillo de la g-tubulina controla a los microtúbulos astrales y polares, mientras que las proteínas motoras con actividad ATPásica generan las fuerzas antagónicas necesarias para mantener y permitir el crecimiento del huso mitótico. Las quinesinas intervienen en la separación de los centrosomas, manteniendo la bipolaridad del huso mitótico a nivel de la superposición de los microtúbulos polares.

Durante la condensación de la cromatina se forma el quinetocoro y los microtúbulos quinetocóricos que entran en relación con las dineínas regulando la polimerización y la organización de estos microtúbulos en relación con los microtúbulos polares del huso (Fig. 9.7 A). Los movimientos del centrosoma hacia los polos y de los cromosomas hacia la placa ecuatorial están bajo control de las proteínas motoras de los microtúbulos. Los microtúbulos quinetocóricos actúan como exploradores del medio hasta que son “capturados” por las proteínas motoras dineínas de los microtúbulos polares. Esta captura los relaciona con los microtúbulos polares con una polaridad opuesta y los estabiliza entremezclando los unos con los otros (Fig. 9.7 A). De esta manera los cromosomas pasan bajo el control de los centrosomas donde la polimerización y despolimerización de los microtúbulos quinetocóricos son regulados por los centrosomas y las dineínas. Este control hace que los cromosomas lleguen por un trayecto más o menos directo al ecuador del huso mitótico y se coloquen en posición metafásica (Fig. 9.7 B). Los mecanismos moleculares de este desplazamiento no se conocen.

Cuando culmina la profase, la región del extremo *plus* de los microtúbulos polares se “engranar” por medio de proteínas que estabilizan a los microtúbulos opuestos (Fig. 9.7 B). Las quinesinas con su actividad ATPásica repulsan los microtúbulos polares antiparalelos por ende a los centrosomas, generando una fuerza que tiende a separar aún más los dos polos del aparato mitótico formando al aparato mitótico de la metafase (Fig. 9.7 B). Adicionalmente, esta fase de la mitosis se caracteriza por el establecimiento de microtúbulos quinetocóricos que van desde el anillo quinetocórico del centrómero de cada cromosoma a cada polo del huso entrando en contacto con los centrosomas gracias a las dineínas.

Cuando los microtúbulos polares y quinetocóricos están alineados paralelamente en la metafase no se producen polimerización ni despolimerización, la actividad ATPásica de las proteínas quinesinas en el ecuador y dineínas en la región cercana a los centrosomas induce un “estiramiento” de los microtúbulos polares cuyo efecto mecánico es separar los centrómeros del cromosoma metafásico. Inmediatamente se inicia la despolimerización de los microtúbulos quinetocóricos en el mismo seno del quinetocoro induciendo los movimientos de los cromosomas

hermanos hacia los polos del aparato mitótico. En los movimientos de los cromosomas durante la anafase como durante la profase los brazos de los cromosomas siguen pasivamente el movimiento de sus centrómeros respectivos.

La anafase se termina cuando los cromosomas llegan a la región inmediata del centrosoma respectivo. En la telofase se depolimerizan los microtúbulos polares pero se quedan los extremos *plus* superpuestos donde se forma el anillo actino-miosina II (Fig. 9.7 C).

9.3.4. Citocinesis

Alrededor de la membrana plasmática del lado citosólico donde están superpuestos los microtúbulos polares se forma un anillo de filamentos de actina y miosina que forma el surco de separación. El deslizamiento entre la actina y la miosina induce la reducción del diámetro del anillo y el acercamiento de las membranas, y finalmente la fusión de ellas dando origen a las dos células hijas (Fig. 9.7 C). Pero no se conocen los mecanismos moleculares que controlan la disminución del diámetro del anillo actino-miosina.

En las células animales, la localización del surco de separación está bajo el control del aparato mitótico, se piensa que los microtúbulos con las proteínas estabilizadoras dirigen la formación de este anillo y la citocinesis. Se constata en efecto que la posición del huso determina el tamaño de las células producidas: si en el aparato mitótico la placa ecuatorial no se localiza en el centro de la célula, las células resultantes de la división serán de dimensiones desiguales. Además, la modificación de la posición del aparato mitótico por micromanipulación afecta la localización del surco de separación de la citocinesis. La presencia del aparato mitótico es necesaria para el establecimiento del surco de separación, pero no para su culminación. Una vez que el surco de separación se forma, la citocinesis puede seguir aún que se retire el aparato mitótico por micromanipulación.

9.4. CONTROL DEL CICLO CELULAR

9.4.1. Introducción

Los primeros datos sobre el control del ciclo celular se obtuvieron con experimentos realizados en embriones del sapo *Xenopus leavis*. Se encontró que existe un factor citoplasmático en el oocito fecundado que promueve su maduración estimulando las divisiones celulares. Al inyectar este factor en oocitos no fecundados induce también su maduración, por ésto se le llamó factor promotor de maduración o MPF (*maturation promoting factor*). Se probó más tarde (en los años setenta) la existencia de un factor similar en las células que están en fase M, porque cuando se fusiona una célula en fase M con células en fase G₁, S o G₂ se induce la condensación de la cromatina en cromosomas en estas células. Al factor que se en-

contró en la célula de fase M capaz de inducir la condensación de la cromatina en otras células se le denominó MPF, pero con el significado de factor que promueve la fase M (*M-phase promoting factor*). Más tarde se probó que esos dos factores son moléculas homólogas. De otra parte, en las levaduras se encontró una molécula que ejerce funciones similares a la MPF, pero aparece y desaparece durante las divisiones celulares, por ésto se le llamó **ciclina**.

Desde entonces se ha encontrado en todas las células un sistema de control del ciclo celular dirigido por moléculas. Existen puntos claves o de chequeo durante el ciclo celular que permiten o no a la célula, según las circunstancias internas y externas, iniciar y proseguir su ciclo. Estos puntos de control del ciclo celular pueden ser comparables al sistema de control del botón de una máquina lavadora. Este control del ciclo celular es un proceso continuo y obedece a una jerarquía de interacciones bioquímicas que "verifican" las circunstancias y "deciden" eventualmente el inicio o la entrada a la etapa siguiente del ciclo celular.

En general, se han descrito para las células eucarióticas tres puntos de control importantes que regulan la continuidad del ciclo celular. El primer control se presenta en la fase G_1 , aproximadamente una hora antes de iniciar la fase S, denominado **punto de control G_1** ó de arranque del ciclo, que determina el inicio de la síntesis de moléculas necesarias para la duplicación del ADN e induce el comienzo de la fase S (Fig. 9.8 PCG₁). El segundo punto de control se encuentra entre la fase G_2 e inicio de la fase M, denominado **punto de control M**, que determina el inicio de la mitosis (Fig. 9.8 PCM). Si la duplicación del ADN es incompleta se bloquea la entrada a la mitosis. El tercer punto de control se denomina **punto de control metafásico** e interviene en la transición de metafase a anafase y la culminación de la mitosis (Fig. 9.8 PCMet).

Las moléculas que controlan el ciclo celular pertenecen a dos familias de proteínas: la primera familia se denomina **ciclinas** porque se sintetizan y se degradan durante cada ciclo celular; y la segunda es una familia de proteínas quinasas serina/treonina específicas cuya activación depende de las ciclinas (**Cdk**). Efectivamente, las Cdk necesitan unirse a las ciclinas para poder activarse y así controlar la actividad de otras proteínas que dirigen los procesos del ciclo celular. La separación y degradación de las ciclinas inactiva las Cdk.

Existen dos grandes clases de ciclinas: las **ciclinas G_1** que se unen a las Cdk durante la fase G_1 e intervienen en el punto de control G_1 (Fig. 9.8 Cic G_1), y las **ciclinas de mitosis** ó ciclinas M (Fig. 9.8 CicM) que se unen a las moléculas Cdk al final de la fase G_2 y regulan el punto de control M determinando la iniciación de la fase M. El complejo Cdk-ciclinaM es el MPF (*M-phase promoting factor*) y se encuentra en todas las células en mitosis (Fig. 9.8 MPF). El punto de control metafásico está determinado por la liberación de la ciclina M del complejo MPF y su rápida degradación. La regulación exacta de este punto de control no se conoce, pero si algún cromosoma no se une al aparato mitótico la ciclina M no se libera y la célula queda bloqueada en este punto de control, es decir que no se produce la segregación de los cromosomas.

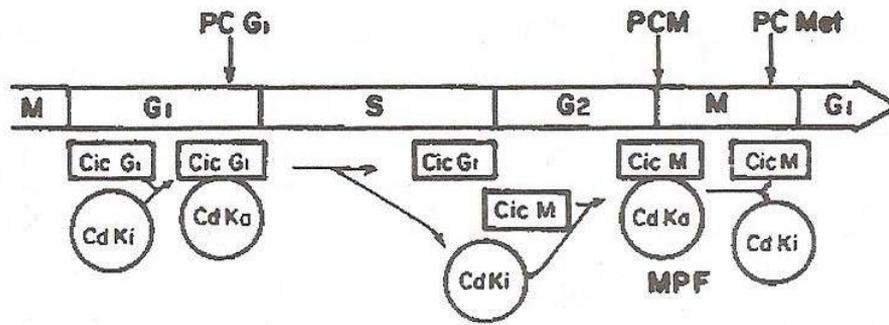


Figura 9.8. Puntos de control del ciclo celular.

Existen tres puntos de control del ciclo celular: el PCG₁, el PCM y PCMet. El PCG₁ está regulado por el complejo Cdk-ciclina G₁ activado, el PCM por el MPF formado por el complejo Cdk-ciclina M, y el PCMet por la liberación de la ciclina M de la Cdk y su rápida degradación. PCG₁: punto de control G₁; PCM : punto de control de mitosis; PCMet: punto de control metafásico; Cdk_i: proteínas quinasas dependientes de ciclinas inactiva; Cdk_a: proteínas quinasas dependientes de ciclinas activada; CicG₁: ciclina G₁; CicM: ciclina de mitosis; MPF: *M-phase-promoting factor*.

En la fase G₁ se inicia la síntesis de la ciclina G₁, la cual se une a la Cdk activándola y determinando el punto de control de G₁, generalmente una hora antes de la duplicación del ADN.

La unión de la ciclina M a la Cdk es necesaria pero no es suficiente para activar el MPF. La activación de la Cdk del MPF es un proceso complejo donde intervienen fosforilaciones y desfosforilaciones sucesivas (Fig. 9.9). Primero, la Cdk del complejo Cdk-ciclinaM es fosforilada dos veces por la *cdk-activating kinase* (CAK) y la *cdk-inhibitory subunits* (CKI), y después una fosfatasa específica de la Cdk desfosforila el fosfato añadido por la CKI, lo que desencadena la actividad del MPF (Fig. 9.9). Es de anotar que la activación del MPF necesita la acción coordinada de al menos otras tres enzimas reguladas ellas mismas por otros factores incluyendo las Cdk y las ciclinas denominadas auxiliares.

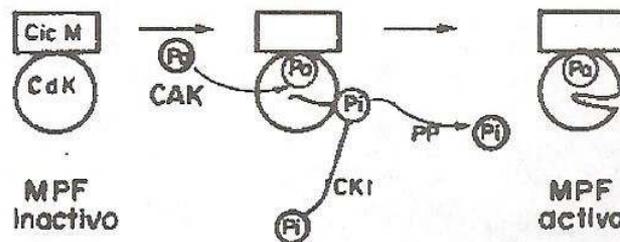


Figura 9.9. Mecanismo de activación del MPF (*M-phase-promoting factor*).

Al final de la fase G₂, la Cdk del complejo MPF sufre primero una fosforilación activadora realizada por la CAK seguida de una fosforilación inactivadora del sitio catalítico por una CKI. Posteriormente una fosfatasa de la Cdk desfosforila el fosfato del sitio catalítico activando el complejo MPF. CicM: ciclina de mitosis; Cdk: quinasas dependientes de ciclinas; Pa: fosforilación de activación; CAK: *cdk-activating kinase*; Pi: fosforilación de inactivación; CKI: *cdk-inhibitory subunits*; PP: fosfatasa que desfosforila el fosfato de inactivación.

Los mecanismos moleculares del control del ciclo celular son más conocidos en las levaduras y se empieza a comprender en las células de otros eucariotes incluyendo el ser humano.

9.4.2. Control del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

El control del ciclo celular en las levaduras que se duplican por fisión como *Schizosaccharomyces pombe*, es relativamente sencillo (Fig. 9.10 A). La proteína quinasa dependiente de la ciclina, denominada Cdc2 se une a la ciclina Cdc13 y determina la iniciación de la fase S. La Cdc13 se disocia de la Cdc2 y es degradada al finalizar la fase S. En la fase G₂ la proteína quinasa Cdc2 se une a una ciclina M, principalmente la Cig2 o eventualmente la Cig1, formando el complejo MPF inactivo. En estas levaduras la función de CAK es realizada por la proteína quinasa MO15 y la de la CKI por la proteína quinasa Wee1 (Fig. 9.9). La fosfatasa Cdc25 desfosforila el fosfato de inactivación de la Cdc2 liberando el sitio catalítico de la quinasa Cdc2 y así activa el complejo MPF que inicia la mitosis.

En estas levaduras un complejo auxiliar de Cdk-ciclina (Mos6-Mes2) actúa como CAK. La proteína quinasa Mos6 se la llama también Mop1 o Crk1.

9.4.3. Control del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*

En las levaduras que proliferan por gemación (*budding*) como *Saccharomyces cerevisiae*, el control del ciclo celular es más complejo (Fig. 9.10 B). El equivalente de la Cdc2 o Cdk es la Cdc28, pero se asocia a diferentes ciclinas para controlar el ciclo celular. Estas levaduras tienen tres ciclinas G₁, denominadas Cln1, Cln2 y Cln3, que controlan la iniciación de la fase S. Tienen también otras seis ciclinas, las Clb1 a 6, que gobiernan el ciclo celular a partir del inicio de la fase S hasta la culminación de la fase M. La regulación se comienza con la unión de la ciclina Cln3 a la proteína quinasa Cdc28 (no está en la Fig. 9.10 B), que activa la transcripción de las ciclinas Cln1 y Cln2. Las ciclinas Cln1 y 2 se unen a la Cdc28 aumentando su propia transcripción y la de las ciclinas Clb5 y Clb6. Las ciclinas Clb5 y 6 se unen a la Cdc28. En estas levaduras el arranque de la fase S se realiza por la unión de la Cdc28 a las Cln1 y 2, y posteriormente a las ciclinas Clb5 y 6. Los complejos Cdc28-Clb5 y Cdc28-Clb6 inducen la síntesis de las ciclinas Clb1 a 4. La unión de las Clb3 y 4 a la Cdc28 regula la finalización de la fase S y prepara el inicio de la fase M. El MPF del punto de control M corresponde a los complejos Cdc28-Clb1 y Cdc28-Clb2 que controlan la entrada a la mitosis en combina-

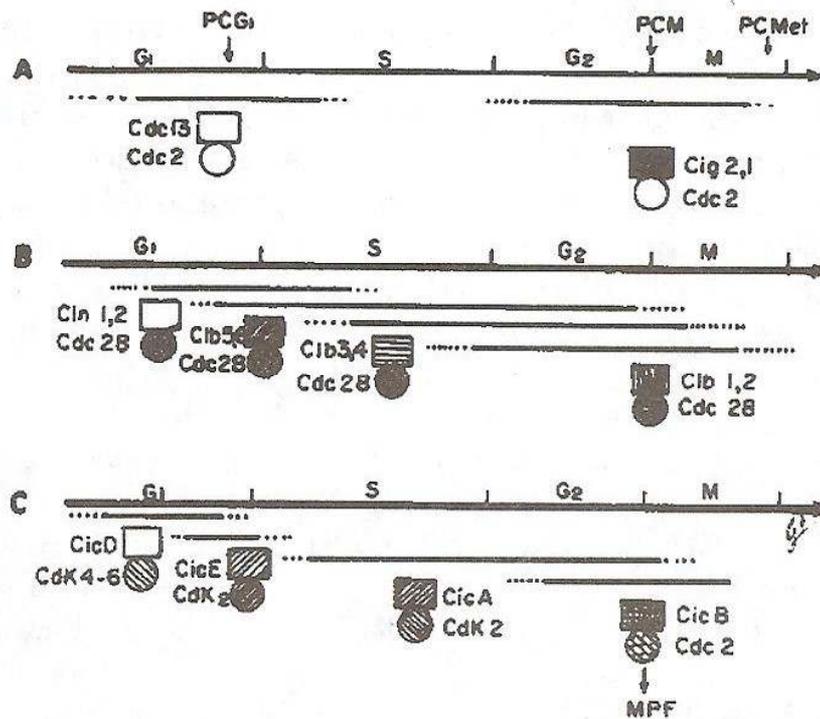


Figura 9.10. Los principales complejos Cdk-ciclina que controlan el ciclo celular en:

A. Levaduras que proliferan por fisión, *Schizosaccharomyces pombe*.

B. Levaduras que proliferan por gemación, *Saccharomyces cerevisiae*.

C. Las células eucarióticas de organismos superiores, incluyendo el ser humano.

La Cdk se asocia sucesivamente con diferentes ciclinas para su actividad de proteína quinasa. La degradación de las ciclinas conlleva a la inactividad de la Cdk correspondiente. Las líneas debajo de cada ciclo celular indican el tiempo aproximado de activación de cada complejo. El inicio de la activación de cada complejo está indicado por su posición.

Rectángulos: representan las ciclinas; Círculos: representan las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk); PCG₁: punto de control G₁; PCM : punto de control de mitosis; PCMet : punto de control metafásico; MPF: *M-phase-promoting factor*; G₁, S, G₂ y M: fases del ciclo celular.

ción con los Cdc28-Clb3 y Cdc28-Clb4. No se han determinado aún las proteínas quinasas CAK y CKI que intervengan en la activación del MPF en estas levaduras.

Los mecanismos descritos en las levaduras son los más conocidos y ayudan a comprender de manera simplificada el control del ciclo celular, porque se conocen alrededor de 70 genes en levaduras (la mayoría de ellos clonados y secuenciados) que intervienen en los diferentes procesos del ciclo celular.

9.4.4. Control del ciclo celular en las células eucarióticas de organismos superiores

En los organismos multicelulares el control del ciclo celular debe ser necesariamente más complejo que en las levaduras, porque la selección natural actúa

sobre el organismo y no solamente sobre una célula como ocurre en los organismos unicelulares. En los organismos multicelulares, la proliferación celular debe ser adaptada a la necesidad de un tejido determinado y finalmente al buen funcionamiento de todo el organismo. En casos contrarios se produce una proliferación celular no controlada (tumores) y destruye el organismo (Ver capítulo 10). De otra parte, es más difícil estudiar el ciclo celular en los organismos multicelulares, porque la mayoría de sus células son diferenciadas y no se dividen. Muchos datos sobre este tema vienen de estudios en células cultivadas que ya no están en su ambiente natural.

Efectivamente, en los eucariotes superiores como en el ser humano, se han encontrado al menos 10 proteínas quinasas dependientes de ciclinas aparentemente equivalentes a la Cdc2, y más de 9 familias de ciclinas (A, B, C, D, E, F, G, H y la p53), lo que hizo pensar a múltiples combinaciones complejas de las Cdk con las ciclinas. Pero no es el caso, sólo la Cdc2, la Cdk1 y la Cdk2 son funcionalmente homólogas a la Cdc2 o a la Cdc28 de las levaduras. Las otras Cdk prestan una ayuda auxiliar en el ciclo celular o incluso no intervienen en su regulación. La figura 9.10 C es un resumen del control del ciclo celular en los eucariotes superiores, específicamente de células humanas.

En las células eucarióticas superiores la transición de la fase G_1 a la fase S es muy poco conocida. Las proteínas quinasas Cdk4 y Cdk6 se unen a la ciclina D en la fase G_1 y colaboran con el complejo Cdk2-ciclina E en el control de la iniciación de la fase S. Los complejos Cdk4-ciclinaD y Cdk6-ciclina-D no son indispensables en el punto de control G_1 pero colaboran en la mediación de las señales del medio extracelular. La proliferación celular en los vertebrados generalmente necesita la presencia de factores de crecimiento que actúan concomitantemente con los inductores del ciclo celular (Ver 9.4.5). Muchas células responden a los factores de crecimiento activando los complejos Cdk4-ciclinaD y Cdk6-ciclinaD (Fig. 9.10 C). Estos complejos intervienen en el punto de control G_1 .

Para el inicio de un nuevo ciclo celular (o arranque de la fase S), todos los argumentos indican que es necesario inhibir o suprimir el efecto antiproliferativo de proteínas específicas que existen normalmente en las células. Ya se conocen al menos dos proteínas, la Rb y la p53, cuya ausencia hereditaria o por mutación de los dos alelos en las células somáticas predisponen al desarrollo de varios tipos de cáncer (Ver capítulo 10), es decir una proliferación celular no controlada. El aumento artificial del nivel de la proteína p53 en las células cultivadas inhibe su proliferación. Esta proteína se une al ADN y estimula la transcripción de una proteína reguladora de genes cuyo producto es una proteína de 21 kD que se une a la quinasa del complejo de la Cdk2-ciclinaE bloqueando su actividad quinásica y la iniciación de la fase S. La proteína p53 se sintetiza cuando existen daños en el ADN celular e interviene para bloquear la iniciación de la fase S y eventualmente induce la apoptosis de estas células.

La proteína Rb (de retinoblastoma) se encuentra normalmente en las células. Cuando esta proteína está alterada o ausente por herencia o por mutación somática, las personas desarrollan tumores de la retina, denominado retinoblastoma. El gen de esta proteína Rb fue el primer gen denominado gen supresor de tumor, y su proteína Rb la primera con efecto antioncogénico. La proteína Rb inhibe la acción de factores de transcripción incluyendo el E2F. La activación de la proteína Rb inhibe el ciclo celular, manteniendo las células en la fase G_0 (Fig. 9.11 G_0). Los factores mitogénicos inducen la proliferación celular activando el complejo Cdk4-ciclinaD de la fase G_1 que fosforila la proteína Rb. La fosforilación de la proteína Rb la inactiva, es decir que se liberan los factores de transcripción E2F que inducen la transcripción de genes necesarios en fase S como los genes de las ciclinas E, A y de ellos mismos. La ciclina E sintetizada se une a la Cdk2 e inicia la fase S, mientras que la ciclina A sintetizada se une a la Cdk2 y finaliza la fase S (Fig. 9.10 C). Después de la fase S el complejo Cdk2-ciclinaA fosforila el factor E2F inhibiendo su acción. La Cdk4 se inactiva cuando se libera de la ciclina D y también por el efecto de factores del medio extracelular que inhiben la proliferación. La inactivación de la Cdk4 permite la desfosforilación de la proteína Rb que retoma su función inhibitoria sobre los factores E2F.

Hay que aclarar que existen células que entran en mitosis sin que tengan el complejo Cdk4-ciclinaD, lo que indica que este complejo no es indispensable para que una célula entre en el ciclo celular. Ese complejo parece ser el mediador de activación del ciclo celular únicamente cuando la célula es estimulada por factores mitogénicos del medio extracelular.

Las proteínas E6 y E7 de los virus del papiloma que causan las verrugas y están implicados en el desarrollo del cáncer de cuello uterino, y la proteína del antígeno T grande del virus SV40 se unen a las proteínas Rb y p53 inactivándolas, y como consecuencia de estas inactivaciones se produce una proliferación celular no controlada.

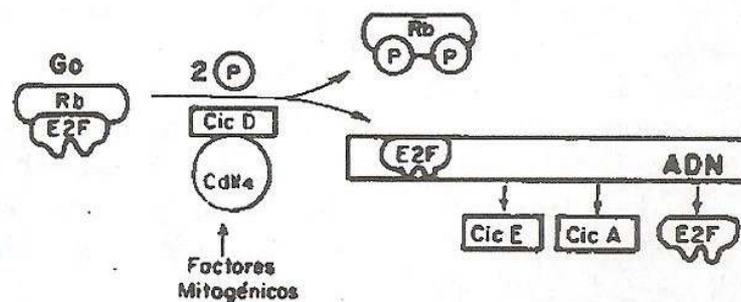


Figura 9.11. Inactivación de la proteína Rb.

La proteína Rb desfosforilada inhibe el ciclo celular en G_0 bloqueando algunos factores de transcripción como los E2F. El complejo Cdk4-CiclinaD activado por factores mitogénicos fosforila a la proteína Rb y la disocia del factor de transcripción E2F. El E2F liberado activa la transcripción de genes específicos como los de las ciclinas E y A y de ellos mismos que inducen la iniciación de un nuevo ciclo celular.

G_0 : fase G_0 ; Rb: proteína del retinoblastoma; CicD: ciclina D; Cdk4: proteína quinasa 4 dependiente de ciclina; ADN: ácido desoxirribonucléico; CicA: ciclina A; CicE: ciclina E.

La iniciación de la fase M es controlada por la unión de la quinasa Cdc2 a la ciclina B (Fig. 9.10 C). El complejo Cdc2-ciclina B es el MPF característico de eucariotes superiores. Ese complejo colabora en algunas circunstancias y en algunas especies en la preparación de la célula para la fase M. En el ser humano se encontró otra Cdk (Cdk3) homóloga a la Cdc2 y la Cdk2, pero todavía no se conoce su intervención en el ciclo celular. La Cdk3 no ha sido detectada en otros mamíferos. En las células de las aves solamente la Cdc2 y la Cdk2 interactúan con la ciclina B3 durante la fase G₂ y M y determinan el inicio de la fase M. Esta ciclina B3 es homóloga a las ciclinas A y B de los mamíferos.

En los eucariotes superiores el control de la activación del complejo MPF no se conoce bien. El complejo Cdk7-ciclinaH actúa como una CAK fosforilando la Cdc2 del complejo MPF (Fig. 9.9). La Cdk7 de las células humanas es la misma MO15 de las levaduras que se dividen por fisión, pero la Cdk7 se activa al unirse a la ciclina H y no sola como lo hace la MO15 en levaduras.

El complejo Cdk7-ciclinaH se une al factor de transcripción TFIIF (Fig. 8.15) y fosforila el extremo carboxil terminal de la ARN poli II. Entonces el complejo Cdk7-ciclinaH interviene no solamente en el control del ciclo celular sino también en la transcripción.

El mecanismo de activación del MPF puede aplicarse a todas las células eucarióticas, pero tiene variaciones. Puede también activarse por el tiempo de acumulación de las ciclinas, o por la actividad de otras ciclinas que se unen a quinasas o a fosfatasas. Otras proteínas quinasas como PKH₁ (proteína quinasa de la histona H₁) y otros complejos Cdk-ciclinas auxiliares intervendrían en la progresión de la fase M.

La regulación exacta del punto de control metafásico no se conoce. La liberación de la ciclina del complejo MPF lo inactiva al finalizar la metafase, pero es indispensable la degradación de la ciclina para pasar el punto de control metafásico. En las células eucarióticas superiores la liberación y la degradación de la ciclina B marca el punto de control metafásico, es decir la inducción de la separación de los cromosomas hermanos que inicia la anafase. Existen otras moléculas diferentes a la MPF que inhiben el inicio de la anafase hasta la formación correcta del aparato mitótico metafásico.

La degradación abrupta de las ciclinas y de las moléculas inhibitoras de la anafase se realiza dentro de un complejo proteico denominado *Anaphase-Promoting-Complex* o ciclosoma. Dentro del ciclosoma las ubiquitinas reconocen las ciclinas y las moléculas inhibitoras de la anafase presentándolas a las enzimas E3 que realizan la proteólisis masiva, lo que desencadena la segregación de los cromosomas.

9.4.5. Efectos de los factores de crecimiento sobre el ciclo celular

En el ser humano el crecimiento armonioso y el mantenimiento de los tejidos en la vida adulta dependen de las interacciones y de las combinaciones de múltiples factores. Entre otros, los sistemas nervioso y endocrino. Por ejemplo, sin la insulina la vida sería imposible y sin la hormona de crecimiento (HG) el desarrollo de una persona no alcanza el tamaño normal y se convierte en un enano. Al lado de las

hormonas cuyas concentraciones en la sangre son relativamente grandes y se pueden detectar fácilmente existen muchos otros factores de crecimiento cuyas concentraciones en la sangre son muy bajas y actúan sobre todo de manera paracrina. Algunos factores de crecimiento y sus acciones están resumidos en la Tabla 9.1. Los factores de crecimiento al lado de sus efectos sobre la proliferación de las células (efecto mitogénico) tienen muchos otros efectos a nivel celular como la supervivencia, el crecimiento, la migración, la diferenciación, etc. En esta sección se describe solamente el efecto mitogénico de los factores de crecimiento. La activación del ciclo celular se encuentra generalmente en el punto de control G1, donde intervienen principalmente los factores mitogénicos extracelulares.

Tabla 9.1. Factores de crecimiento y su acción.

Factor de crecimiento	Familias relacionadas	Acción
Derivado de plaquetas (PDGF), 3 subtipos		Estimula la proliferación de las células del tejido conectivo y células de la neuroglia.
Epidémico (EGF)	Factor de crecimiento transformante α (TGF- α)	Estimula la proliferación de muchas células epiteliales.
Transformante β (TGF- β) múltiples subtipos	Activinas; Prots. morfo-genéticas hueso (MBP)	Inhibe la proliferación. Con otros factores favorece la proliferación de muchos tipos celulares.
Similar a la insulina-1 (IGF-1)	Insulina, IGF-2	Promueve la supervivencia celular. Estimula el metabolismo de las células, colabora con otros factores de crecimiento en la duplicación del ADN.
Fibroblástico (FGF) múltiples subtipos		Estimula la proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares. Inhibe la diferenciación de células progenitoras. Acción trófica en la diferenciación de células endocrinas.
Nervioso (NGF)	Factores neurotróficos derivados del cerebro (BDNF); neurotrofinas -3 y 4 (NT-3 y NT-4)	Promueve la supervivencia y los procesos del crecimiento del nervio.
Interleuquina-2 (IL-2)		Estimula la proliferación y la activación de los linfocitos T.
Interleuquina-3 (IL-3)	Factores estimulantes de colonias (CSFs)	Estimula la supervivencia y proliferación de diferentes células precursoras de la sangre.
Interleuquina-7 (IL-7)		Estimula la proliferación y la activación de los linfocitos B.
Necrosis Tumoral (TNF)	Linfoquinas (LT)	Estimula la proliferación e induce diferenciación de los linfocitos T y B. Actúa como mediador de la inflamación sobre diferentes células.
Eritropoyetina	Factores hematopoyéticos	Promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células progenitoras de los glóbulos rojos.
Neuropéptidos mitogénicos	Bombesina y proteínas relacionadas. Vasopresina, Bradiquinina, Péptido vasoactivo intestinal (VIP)	Estimulan la proliferación de fibroblastos y células epiteliales en cultivo.
Hormona tireotrópica (TSH)		Estimula la supervivencia y proliferación de las células tiroideas.
Hormona de crecimiento (GH)		Estimula la proliferación de las células en general durante el crecimiento de los individuos.

Se ha visto, en el capítulo tres, que los factores de crecimiento (EGF, FGF, PDGF, etc) se unen a los receptores de las células diana desencadenando diferentes mecanismos de transducción. La cascada de estas reacciones enzimáticas activan la transcripción de genes y luego contribuyen en la preparación y culminación del ciclo celular. En el capítulo 8 se describió cómo las hormonas esteroides activan la transcripción de diferentes genes incluyendo los de los factores de transcripción. La gran mayoría de los genes normales cuya modificación de su expresión los convierten en oncogenes (genes del cáncer) codifican factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, proteínas quinasas tirosina específicas o factores de transcripción.

Para estimular la proliferación y la diferenciación celular es necesario una cascada de reacciones que llevan la señal extracelular al núcleo. El sistema de intermediarios involucra múltiples cascadas de interacciones de fosforilaciones serina/treonina de las proteínas y se mantienen activas durante más tiempo que las proteínas fosforiladas sobre sus tirosinas. Muchas proteínas quinasas serina/treonina específicas están involucradas en estas cascadas, pero una familia de proteínas denominadas quinasas de las proteínas activadas por mitógenos (MAPK) parecen jugar un papel importante (Fig. 9.12). Estas proteínas quinasas son activadas por una gran gama de mediadores extracelulares que inducen la proliferación y diferenciación celular. La mayoría de estos mediadores se unen a receptores con actividad de proteína quinasa tirosina específica (Fig. 3.10), algunos a receptores que activan directamente proteínas quinasas tirosina específicas (Ver 3.3.2.3.3), y otros a receptores que activan proteínas G triméricas (indirectamente las PKC) (Ver 3.3.2.2).

Los factores de crecimiento inducen una rápida activación de la transcripción de los genes *fos* y *myc*, Por ejemplo, el EGF y el PDGF al unirse a sus receptores estimulan en los primeros 10 a 20 minutos la transcripción de los genes *fos* y *myc*, y decae su expresión después de 1 a 2 horas. En las células que se encuentran en G_0 , la expresión del gen *fos* es indispensable para activar la fase G_1 y la entrada al ciclo celular. La proteína *fos* puede activar la transcripción de genes o unirse a otro factor de transcripción, el *jun*, para formar el complejo AP1 que es una proteína reguladora de genes y activa la transcripción de genes específicos (Fig. 9.12).

El primer mecanismo de transducción conocido que estimula la proliferación celular es la activación de las proteínas quinasas C (PKC). Por ejemplo, los ésteres de forbol, que son cancerígenos, estimulan la proliferación celular activando las proteínas PKC. Las hormonas como la TSH, la ACTH y la angiotensina estimu-

lan la proliferación de las células diana principalmente por la activación de las PKC. Las PKC fosforilan la proteína quinasa treonina/serina específica *raf* que activa por fosforilación el factor de transcripción *jun* y de otros factores de transcripción (Fig. 9.12 1). La proteína *jun* activada estimula la transcripción de genes que intervienen en la activación del ciclo celular. Las PKC pueden también activar las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) que intervienen en la estimulación de la proliferación celular.

La activación completa de las MAPK requiere de la fosforilación de una treonina y de una tirosina separadas por un aminoácido. Este mecanismo de activación se considera extremadamente selectivo ya que generalmente esos dos aminoácidos son fosforilados por enzimas diferentes. La MAPK es activada por una quinasa MAPK (MAPKK), y la MAPKK es activada por una quinasa MAPKK (MAPKKK).

La MAPK activada migra al núcleo donde fosforila los factores de transcripción Elk1 y *jun*, y activa una proteína reguladora de genes con dominio SH2 (Fig. 9.12). El Elk1 activa la transcripción del gen *fos*. Como se mencionó el complejo *jun/fos* denominado AP1 es una proteína reguladora de genes que activa la transcripción de genes indispensable para la proliferación celular. Pero el papel exacto de la AP1 en la estimulación de la proliferación celular queda por definirse. La respuesta temprana a un factor mitogénico es la transcripción de *jun*, *fos* y *myc* que activan otros genes que determinan la respuesta tardía, incluyendo la expresión de las proteínas Cdk y de varias ciclinas que inician el ciclo celular.

Existen otras proteínas quinasas, relacionadas con las MAPK, activadas por mitógenos y conocidas como ERK (*extracellular signal regulated protein kinases*). Las ERK son activadas principalmente por receptores de los factores de crecimiento con actividad de proteína quinasa tirosina específica (RTK) (Fig. 9.12 RTK) y por receptores que activan proteínas quinasas tirosina específicas (Fig. 9.12 PKT), e intervienen en la activación de la proteína *ras*, la MAPKK, la MAPKKK y otras proteínas quinasas. La *ras* estimulada por la ERK activa la proteína quinasa serina/treonina específica *raf* e interviene en la activación de la MAPK. Las ERK activadas son muy rápidamente desfosforiladas por proteínas fosfatasas tirosina específicas (PTP), pero alcanzan a fosforilar las proteínas que desencadenan la cascada de las reacciones descritas.

Los factores mitogénicos estimulan una cascada de reacciones que culminan con la proliferación celular, pero diferentes vías de transducción se entremezclan e interactúan entre sí.

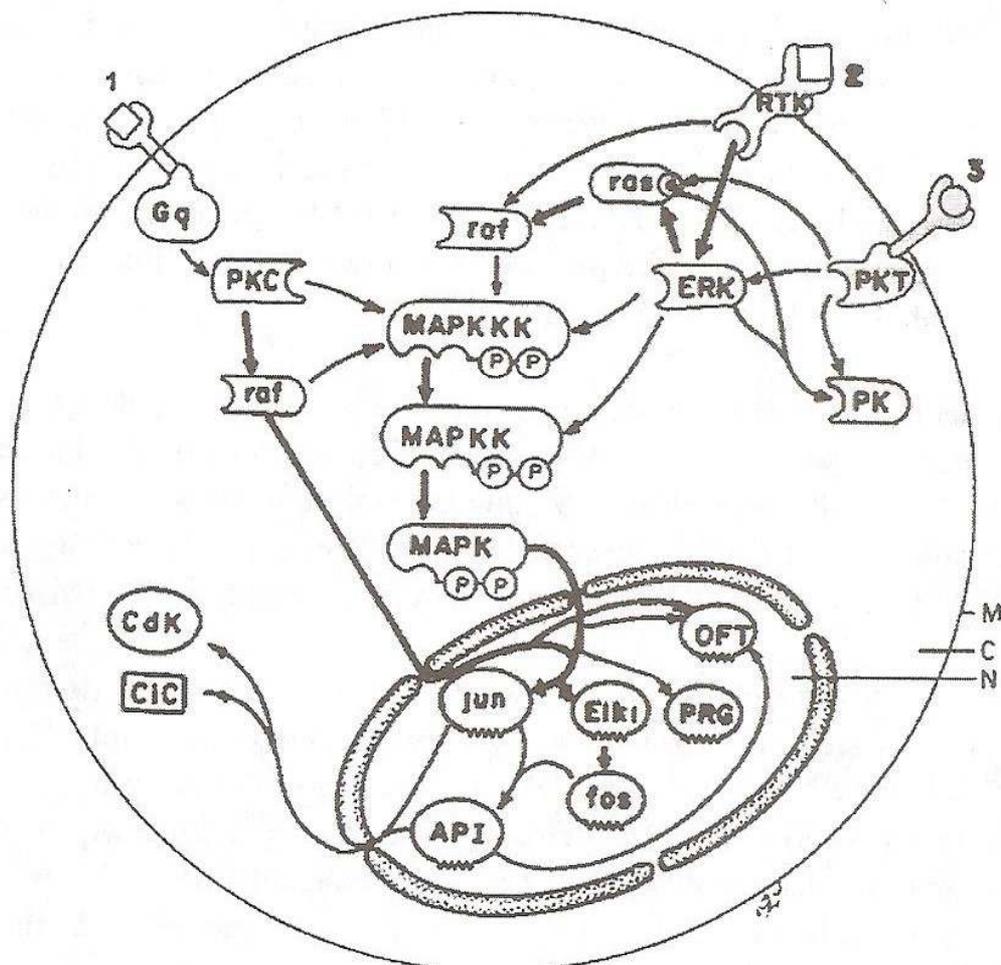


Figura 9.12. Principales mecanismos de transducción de factores mitogénicos.

1. Receptores activan la PKC que fosforila la proteína raf. La raf activa el factor de transcripción *jun* y otros factores de transcripción (OFT). La proteína *jun* estimula la transcripción de genes que intervienen en la activación del ciclo celular.

2. Los RTK activan las ERK y la raf. Las ERK activan la *ras* que activa la raf. Las ERK, las *ras* y la raf activadas intervienen en la activación de la MAPK. La MAPK activada migra al núcleo donde activa las *Elk₁* y *jun* y una PRG. El *Elk₁* activa la transcripción del gen *fos*. El complejo *jun/fos* (AP1) activa la transcripción de genes como los de las ciclinas y de las Cdk indispensable para la proliferación celular.

3. Receptores que activan directamente las PKT que estimulan las ERK, la *ras* y otras proteínas quinasas (PK) e intervienen también finalmente en la activación de la MAPK (Modificado a partir de Cobb y Goldsmith, 1995 y Robinson y Cobb, 1997).

Gq: proteína G trimérica que activa la fosfolipasa C; PKC: proteína quinasa C; PKT: proteína tirosina quinasa; ERK: *extracellular signal-regulated protein kinases*; *ras*: proteína G monomérica; *raf*: proteína quinasa treonina/serina específica; MAPK: proteína quinasa de proteínas activadas por mitógenos; MAPKK: proteína quinasa de MAPK; MAPKKK: proteína quinasa de MAPKK; *jun*: proteína reguladora de la transcripción; *fos*: proteína reguladora de la transcripción; AP1: complejo *jun/fos* regulador de genes; *Elk₁*: factor de transcripción; OFT: otros factores de transcripción como el *myc*; PRG: proteína reguladora de genes con dominio SH2; Cdk: proteínas quinasas dependientes de ciclinas; Cic: ciclinas.

9.5. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR

Los progresos de la medicina han aumentado la esperanza de vida, pero la duración máxima de la vida no ha cambiado de manera significativa durante la historia. Dicho de otra manera, un número más grande de individuos llegan a una edad avanzada, pero la edad máxima sigue siendo la misma. Las diversas hipótesis que han sido elaboradas para explicar el envejecimiento han ubicado su causa en las células.

Una de las teorías de la senescencia supone que se produce en el seno de las células una acumulación progresiva de daños o errores no corregidos producidos al azar. El segundo grupo de teorías postula que la senescencia es simplemente la continuación del programa genético que controla el desarrollo del organismo. En extremo, se admite aún la presencia de genes que programan el envejecimiento. Este grupo de teorías dan una gran importancia al hecho de que ciertas manifestaciones del envejecimiento (la menopausia, por ejemplo) son previsibles y programadas genéticamente. No es posible actualmente determinar si una sola teoría o en combinación con otras, permitan explicar la biología del envejecimiento.

9.5.1. Límite de multiplicación celular

La multiplicación de los fibroblastos normales humanos en cultivo ha sido estudiada con gran precisión por Hayflick (1961), que ha puesto en evidencia una serie de características del tiempo de vida celular normal basado en el cultivo de las células a partir de organismos de diferentes edades.

El crecimiento de las células normales en cultivo es limitado a un cierto número de divisiones. Este límite no tiene nada ver con la inhibición de contacto, se observa aún cuando se diluyen las células cada vez que llegan a confluencia en el recipiente de cultivo. No importa lo que se hace, al final de cierto tiempo, las mitosis ocurren menos y luego desaparecen, y finalmente las células cambian de forma y acaban por morir.

Existe una relación inversa entre la edad del donador de las células y el número de divisiones observadas para los fibroblastos en cultivo. Así, los fibroblastos fetales paran su proliferación después de 50 divisiones en promedio, los de donadores adultos de 40 años después de 40 divisiones y los de 80 años después de 30 divisiones. Este fenómeno ha sido denominado senescencia celular por depender de la edad del cuerpo donador de las células para el cultivo. Además, comparando las células de diferentes especies animales, se constata una cierta correlación entre la duración de vida de la especie y el número de divisiones de sus fibroblastos observadas en cultivo.

La congelación de las células no afecta el número de divisiones. Cuando son de nuevo puestas en cultivo, después de haber sido conservadas por congelación, las células "se acuerdan" del número de divisiones que ya habían cumplido antes de la congelación.

La velocidad con la cual los fibroblastos humanos emigran en el medio de cultivo a partir del fragmento de tejido disminuye con la edad del donador.

Para Hayflick, el envejecimiento de las células en cultivo está asociado al envejecimiento del organismo y cada célula normal tiene una duración de vida limitada.

El potencial limitado de división o proliferación finita normal es actualmente aceptada por la mayoría de los investigadores. Sin embargo se producen ciertas modificaciones celulares que se traducen en envejecimiento antes de que el límite de división haya sido alcanzado. De otra parte, hay que subrayar que a escala del organismo, las manifestaciones del envejecimiento no son tanto debidas a las células en multiplicación sino a las células muy especializadas que ya no se dividen. Las bases de los mecanismos de senescencia son tal vez los mismos en los dos tipos de células, pero el proceso de renovación de los componentes celulares debe ser igualmente considerada en las células que ya no se dividen.

Las líneas celulares establecidas en cultivo, las células transformadas en cultivo y las células cancerosas son inmortales, y pueden proliferar indefinidamente porque tienen alteraciones en sus genomas.

Las células que conservan la capacidad de dividirse en el organismo se denominan progenitoras que dan origen durante toda la vida del organismo a células que se diferencian. Lo anterior contradice a las teorías de Hayflick en el sentido de que las células progenitoras pueden dividirse muchas más veces que lo señalado en cultivo.

9.5.2. Degradación de constituyentes celulares

En la sección 6.4.1 se describió que la concentración de los constituyentes de la célula es el resultado de un equilibrio entre los procesos de síntesis y de degradación. Prácticamente todas las proteínas celulares son renovadas durante la vida de la célula. Existen variaciones muy grandes en la velocidad de degradación de las diferentes proteínas. Para el hígado de rata, por ejemplo, el promedio de la vida-media de las enzimas es de 2 a 3 días. De manera general, las enzimas que tienen una función de regulación metabólica importante son degradadas más rápidamente.

La degradación de proteínas intracelulares anormales ha sido estudiada para intentar precisar su papel eventual en el envejecimiento celular. Las proteínas defectuosas, aunque hagan parte del sistema de síntesis proteica, pueden ser eliminadas. Sin embargo, es posible formular una teoría análoga del envejecimiento, basada sobre la aparición de proteínas defectuosas en el sistema de degradación más bien que en el sistema de síntesis.

La degradación de las proteínas intracelulares es un proceso regulado y puede ser afectada por hormonas, sustancias farmacológicas o la dieta. De otra parte, ha sido sugerido que el crecimiento celular sería parcialmente debido a una disminución de la degradación.

Las enzimas que intervienen en la degradación de proteínas intracelulares son mal conocidas. Sobre la base de imágenes de autofagia y del hecho de que los lisosomas son las únicas estructuras celulares con una gran cantidad de proteasas, se admite que las hidrolasas lisosomiales están implicadas. Pero, de ninguna manera se ha probado que sean las únicas enzimas implicadas. Efectivamente, las ubiquitinas de los proteosomas y de los ciclosomas reconocen las proteínas destinadas a ser degradadas y colaboran en la proteólisis citosólica.

9.6. BIBLIOGRAFÍA

- Cobb, M.H. & E.J. Goldsmith. *How MAP kinases are regulated*. J. Biol. Chem., 270: 14843-14846, 1995.
- DePamphilis, M. *Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells*. Curr. Opin. Cell Biol., 5: 434-441, 1993.
- Gruss, C., C. Gutierrez, W. Burhans, M.L. DePamphilis, T. Koller T. & J.M. Sogo. *Nucleosome assembly in mammalian cell extracts before and after DNA replication*. EMBO J., 9: 2911 - 2922, 1990.
- Gruss, C. & J. Sogo. *Chromatin replication*. BioEssays, 14 (1): 1 - 8, 1992.
- Heald, R. & F. McKeon. *Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis*. Cell, 61: 579 - 589, 1990.
- Hyams, J.S. & B.R. Brinkley. *Mitosis, Molecules and mechanisms*. Ee. Academic Press Inc., San Diego, 1989.
- Johnson, R. T. & P.N. Rao. *Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei*. Nature, 226: 717 - 722, 1970.
- Kochanski, R.S. & G.G. Borisy. *Mode of centriole duplication and distribution*. J. Cell Biol., 110 (5): 1599 - 1605, 1990.
- Kudlow, J.E., D.H. MacLennan, A. Bernstein & A. Gotlieb A. *Biology of growth factors. molecular biology, oncogenes, signal transduction, and clinical implications*. Ed. Plenum Press, New York, 1988.
- Lawrence, J.B., R.H. Singer & J.A. McNeil. *Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophin gene*. Science, 249: 928 - 932, 1990.
- López Carrascal, C.E. Identificación de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante huellas dactilares de ADN. Trabajo de grado de Biología, Biblioteca, Dept. Biología, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, Septiembre 1997.
- Morgan, D.O.. *Cyclin-dependent kinase: engines, clocks, and microprocessors*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 13: 261 - 291, 1997.

- Murray, A. & T. Hunt. *The cell cycle, an introduction*. Ed. Oxford University Press, New York, 1993.
- Norbury, Ch. & P. Nurse. *Animal cell cycles and their control*. *Annu. Rev. Biochem.*, 61: 461 - 470, 1992.
- Rao, P.N. & R.T. Johnson. *Mammalian cell fusion studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis*. *Nature*, 225: 159 - 164, 1970.
- Robinson, M. & M.H. Cobb. *Mitogen-activated protein kinase pathways*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 180 - 186, 1997.
- Waterfield, M. D. *Growth factors*. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1989.
- Yamashita, S. & J.L. Maller. *Identification of an activador required for elevation of maturation-promoting factor (MPF) activity by g-S-ATP*. *J. Cell Biol.*, 110 (5): 1583 - 1588, 1990.