

## ¿POR QUÉ PROLIFERAN LAS CÉLULAS?

LUIS FRANCO VERA \*

\* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad de Valencia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 46100 Burjassot, Valencia. luis.franco@uv.es

### INTRODUCCIÓN

Todo estudioso de la Biología se ha planteado alguna vez preguntas que, como la que da título a este artículo, comienzan con un ¿por qué?, o bien con un ¿para qué? Una respuesta como “las células proliferan porque a partir de una célula inicial tiene que formarse el organismo completo” puede parecer inmediata. Pero esa respuesta estaría formulada desde un planteamiento teleológico<sup>1</sup>, en el que se atribuye a la finalidad una categoría causal. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las ciencias experimentales no pueden dar respuestas últimas a los interrogantes que el hombre se plantea. Una respuesta última es aquella que satisface plenamente todos los órdenes del conocimiento y que no da lugar al planteamiento de una nueva cuestión. Siendo, como son, contingentes las leyes de las ciencias positivas, sus respuestas no pueden ser últimas. A cada respuesta se seguirá otra pregunta, hasta llegar a una pregunta última, un ¿por qué? definitivo, que la ciencia no puede responder. Pero a una pregunta que comience por un ¿por qué?, se puede responder también utilizando el adverbio *porque* en el sentido de establecer una relación entre el efecto observado y las causas que lo producen. Es en este contexto de causas materiales y no finales en el que las ciencias experimentales se mueven y en el que se desarrollará la presente contribución. Ahora bien, las causas de la proliferación celular, como las de cualquier fenómeno biológico, pueden describirse a muchos niveles de complejidad. Como ya apuntó el

Prof. Ángel Martín Municio hace bastante tiempo (1), el nivel molecular penetra hasta los últimos confines estructurales de la realidad y, por tanto, es insustituible la aportación del enfoque que puede proporcionar la Biología Molecular a la descripción y comprensión de los fenómenos biológicos. En esta línea, el presente artículo acudirá una y otra vez a las causas moleculares para dar una respuesta profunda a la pregunta que lo encabeza.

### PROLIFERACIÓN Y DIVISIÓN DE LAS CÉLULAS

Un caso paradigmático de proliferación celular se da en el desarrollo embrionario y fetal. En el caso de nuestra especie, un organismo, cuya vida comienza por el estado unicelular de cigoto, pasa en nueve meses a estar formado por  $10^{13}$ – $10^{14}$  células, formadas todas ellas a partir de la célula inicial. Este proceso supone una multitud de divisiones celulares; a las pocas horas de la fecundación, el cigoto da lugar a un embrión de dos células, las cuales se dividen para formar un embrión de cuatro células, luego de ocho y así sucesivamente. Cada una de las células resultantes de una división recibe la misma información genética contenida en el cigoto, de modo que en una célula somática del organismo adulto se encuentra la misma dotación genética que contenía el cigoto. Naturalmente, a lo largo de ese proceso va cambiando el patrón de expresión de los distintos genes, con lo que

<sup>1</sup> Del griego “telos”, fin.

se produce una especialización celular que se conoce con el nombre de diferenciación. Pero, en cualquier caso, es evidente que han sido necesarias muchas divisiones celulares para pasar de la única célula que poseíamos en nuestro estado de cigoto a esos 10–100 billones de células que tenemos en nuestro organismo adulto.

Hace ya muchos años que los biólogos se comenzaron a plantear el estudio de la división celular. Un requisito para que se dé correctamente, es el que implícitamente se apuntaba antes, es decir, que el material genético de cada célula resultante de una división tiene que ser el mismo que contenía la célula que se ha dividido. Fue en 1880 cuando Starsburger, Flemming y Van Beneden observaron por primera vez al microscopio un proceso de división celular. El material contenido en los núcleos celulares, que se tiñe fácilmente con colorantes básicos, se condensa en el momento de la división, se organiza en forma de unos corpúsculos constantes en número, forma y tamaño según la especie, y se reparte entre las células resultantes. Esos corpúsculos, que se tiñen con los mismos colorantes que el núcleo celular, se comenzaron a denominar entonces *cromosomas*. Se llamó *mitosis* a la etapa de la división en la que los cromosomas son visibles e *interfase* al periodo entre dos mitosis sucesivas, en el cual el material constituyente de los cromosomas forma en el interior del núcleo la *cromatina*, un estado estructural menos compacto, aunque con una organización precisa. Ahora sabemos que el componente portador de la información genética en los cromosomas es el DNA y conocemos con bastante exactitud la estructura que adoptan el DNA y el resto de los componentes cromosomales en la cromatina nuclear y en los cromosomas metafásicos (2). Para el propósito de este artículo, basta ahora con dejar constancia de que es preciso que el material genético de una célula se duplique antes de que entre en mitosis, de manera que cada una de las células resultantes pueda heredar la misma dotación genética. Esa duplicación implica la *replicación* del DNA (2) y la síntesis del resto de los componentes de la cromatina. Con este proceso de duplicación está relacionado el conocido hecho de que en una célula que entra en mitosis existe

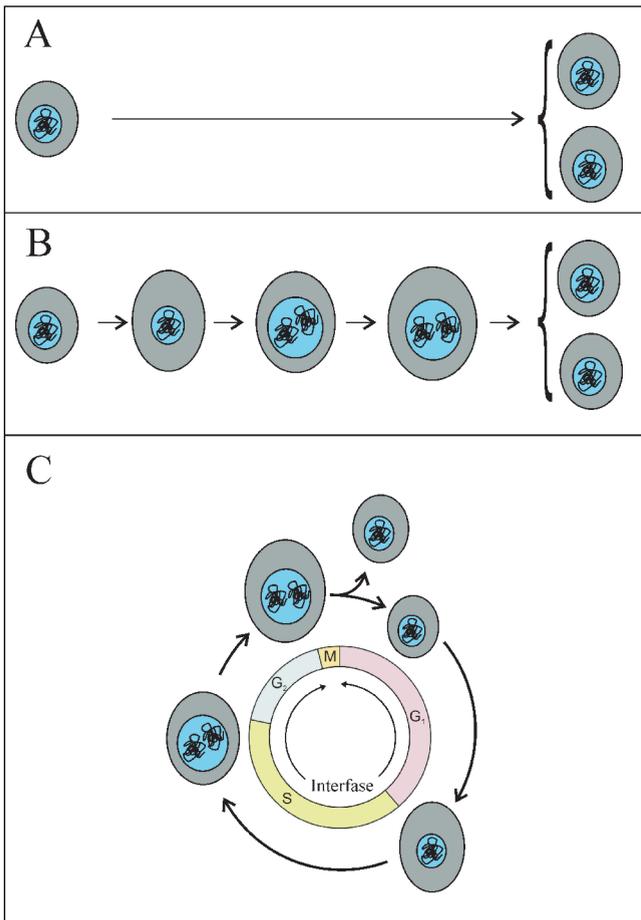
un número de cromosomas doble que el de las células inmediatamente resultantes.

Se acaba de ver que durante el desarrollo embrionario y fetal las divisiones celulares han de ser muy frecuentes, lo que implica que la proporción de células en mitosis sea relativamente elevada. Lo mismo ocurre en todos los casos en que el crecimiento es muy rápido. Pero llega un momento en que la situación cambia, porque el número total de células se mantiene aproximadamente constante a lo largo de la vida adulta. Esto no significa que cese totalmente la división celular. Por restringirnos al caso de la especie humana, en el adulto existen tejidos en los que la división celular ocurre continuamente. Es el caso, por ejemplo, de los tejidos de la piel, en la que, por las agresiones mecánicas y de todo tipo que sufren, se pierden células continuamente y es preciso reponerlas con la división de las preexistentes, por lo que al observar al microscopio una sección de piel humana, es fácil encontrar en ella células en mitosis. Hay, por el contrario, órganos en los que la mayoría de sus células no se dividen nunca. Un caso típico es el del sistema nervioso central, cuyas neuronas no entran en división en el adulto<sup>2</sup>. Finalmente, hay otros órganos cuyas células no se dividen ordinariamente, pero pueden hacerlo en respuesta a determinados estímulos. El hígado constituye un ejemplo bien conocido de estos órganos y a ese proceso de división celular condicionada se hará especial referencia en el último apartado de este artículo.

## EL CICLO CELULAR

La figura 1A resume el proceso de la división celular: a partir de una célula inicial resultan dos células idénticas, con la misma dotación genética. Pero, como se acaba de ver, antes de que la división se produzca es necesario que el DNA se replique, así como también resulta necesario un crecimiento celular generalizado que permita que el citoplasma se reparta más o menos a partes iguales entre las dos células resultantes y que éstas tengan un tamaño similar al de

<sup>2</sup> Desde hace poco se sabe que en un cerebro adulto se pueden formar neuronas nuevas. Pero no aparecen como consecuencia de la división de otras neuronas, sino como estado final de la diferenciación de células progenitoras —células madre adultas— que existen en el sistema nervioso central, como en casi todos los órganos adultos.



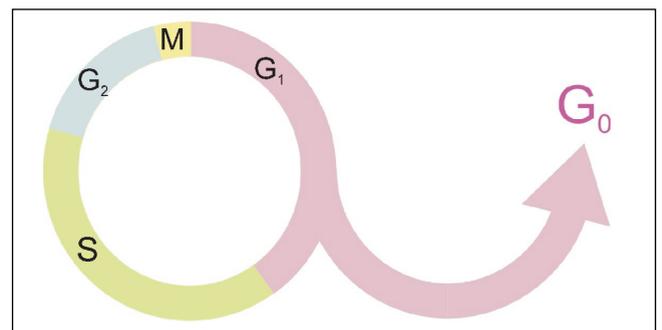
**Figura 1.** A. Esquema de la división celular, que muestra sólo la célula inicial y las dos células hijas. B. La división celular implica el crecimiento de la célula inicial y la replicación de su material genético antes de la división. C. El proceso de la división celular representado en forma cíclica (el ciclo celular). El ciclo se divide en mitosis (fase M) e interfase, que, a su vez, comprende varias fases en las que tienen lugar los acontecimientos señalados en el texto.

la célula inicial<sup>3</sup>. La figura 1B recoge estas precisiones sobre la división celular. Ahora hay que tener en cuenta otra cuestión. Durante un período de crecimiento celular, cada una de las células resultantes es capaz de iniciar otro proceso de crecimiento, replicación del DNA y división, con lo que el esquema de la figura 1B se puede representar en forma cíclica (Fig. 1C). Se comprende así que a la serie de acontecimientos recogidos en esta figura se le dé el nombre de *ciclo celular*, que continúa de forma ininterrumpida mientras dura la proliferación. En este ciclo hay una

fase denominada M, que corresponde a la mitosis. En la interfase, existe un periodo, fase S, en el que tiene lugar la replicación, o síntesis del DNA. Y, en la mayoría de las células, existen otras fases, antes y después de S, que reciben, respectivamente, el nombre de G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. La letra G es inicial de la palabra inglesa *gap*, por denotar esos “huecos” que quedan entre M y S o entre S y M. No hay que pensar que representen simplemente un tiempo de espera; al contrario, suelen ser periodos sumamente activos en el metabolismo celular.

¿Qué ocurre cuando las células dejan de proliferar como les ocurre a algunas cuando, como se acaba de ver, se llega a la edad adulta? Evidentemente, el ciclo celular deja de progresar. Las células abandonan esa sucesión de fases M, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>, y entran en una fase de quiescencia, que suele denominarse G<sub>0</sub>. Se puede decir que las células han interrumpido el ciclo celular (Fig. 2). La fase G<sub>0</sub> es de quiescencia tan sólo en el sentido de que cesa la progresión a lo largo del ciclo, porque esta fase es, de ordinario, funcionalmente muy activa. Piénsese, por ejemplo, que la inmensa mayoría de las células del hígado adulto se encuentran en G<sub>0</sub> y, pese a ello, los hepatocitos se encuentran entre las células más activas de todo el organismo desde un punto de vista metabólico.

Todo lo que se acaba de comentar ocurre en la mayoría de las células de casi todos los organismos. Hay algunas singularidades, como la que se ha anotado antes<sup>3</sup> en relación a los embriones animales, en los que



**Figura 2.** La fase G<sub>0</sub>. En determinadas circunstancias, una célula puede dejar de proliferar, salir del ciclo para entrar en un periodo de quiescencia o fase G<sub>0</sub>.

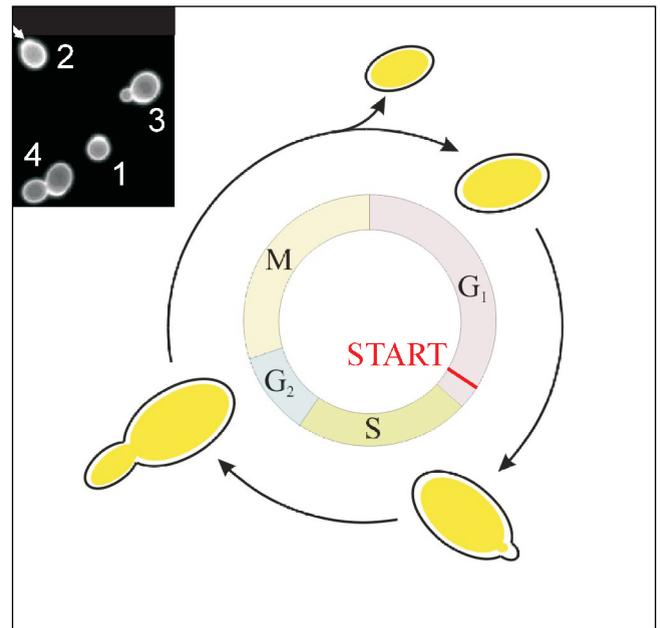
<sup>3</sup> En los primeros estadios de la división embrionaria el citoplasma apenas aumenta de tamaño, de forma que un embrión de cuatro células, por ejemplo, tiene un tamaño prácticamente similar al del cigoto. Naturalmente, cada una de las células tiene menos citoplasma que el cigoto.

las primeras “vueltas” del ciclo celular prácticamente carecen de  $G_1$  y  $G_2$ . También hay diferencias en cuanto a la duración del ciclo o en el tiempo relativo ocupado por cada una de sus fases, pero, en general, los esquemas de las figuras 1 y 2 son válidos para una amplia variedad de células proliferantes o quiescentes.

## REGULACIÓN DEL CICLO Y DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Existen procesos que, una vez iniciados, indefectiblemente continúan. La conocida imagen de una fila de fichas de dominó, en la que basta con derribar la primera para que todas acaben cayendo, sería un ejemplo trivial de uno de aquéllos. Pero el ciclo celular no es así. Una vez iniciado, no tiene que continuar necesariamente a través de todas sus fases. Evidentemente, la posibilidad de abandonar el ciclo para entrar en  $G_0$  ya habla de la existencia de alguna señal que haga responder a las células en un sentido o en otro. Pero hay también otros mecanismos de control que hacen que el ciclo celular momentáneamente se detenga. Gran parte de lo que se conoce actualmente sobre la regulación del ciclo celular se ha aprendido estudiando un organismo concreto: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque esta levadura no constituya un eucariota típico, y su división celular sea peculiar en algunos aspectos, vale la pena dedicar una cierta atención a su división celular y al control de la progresión de su ciclo.

La levadura *S. cerevisiae* se divide por *gemación*. Cuando las células están en proliferación, en un momento dado, aparece en la superficie de una de ellas una yema que va creciendo. Mientras tanto, se produce la replicación del DNA: una copia de los cromosomas se queda en la célula inicial y la otra migra hacia la yema y, cuando ésta ha alcanzado un tamaño suficiente, se produce una tabicación que separa las dos células resultantes. En el inserto de la figura 3 se recoge una imagen microscópica de un cultivo proliferante de levadura, en el que se aprecia una célula aún sin yema, otra con la yema incipiente, una tercera con la yema ya desarrollada y otra a punto de terminar la tabicación. A pesar de estas diferencias con la división de células animales, el ciclo celular sigue las mismas fases. La menor duración del ciclo en levaduras hace que el tiempo relativo dedicado a cada una de las fases



**Figura 3.** El ciclo celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Como se observa en el esquema, a partir de un determinado momento, las células comienzan a desarrollar una yema, que va creciendo hasta dar lugar a una de las células hijas. En el inserto se recoge una imagen microscópica en la que se observa una célula que aún no ha comenzado la gemación (1), otra (2) con una yema incipiente, marcada por una flecha. Una tercera célula (3) tiene ya la yema claramente desarrollada y en la célula 4 la yema está a punto de convertirse en una célula independiente.

sea diferente del de células animales (compárense los ciclos de las figuras 2 y 3).

Como se apuntaba antes, el hecho de que comience el ciclo no significa que la progresión a lo largo de él esté garantizada. En levaduras existe un punto de control cercano al final de la fase  $G_1$ , denominado “start”, en el que la célula *se plantea* una triple pregunta: ¿hay suficiente disponibilidad de nutrientes?; ¿se ha llegado al tamaño adecuado?; ¿hay factores de apareamiento presentes? Si la respuesta a cualquiera de las dos primeras preguntas es negativa, el ciclo se detiene. La lógica es clara: la ausencia de nutrientes impediría la normal proliferación de las células y éstas *optan* por detenerla. Otro tanto ocurriría si la célula no hubiera crecido lo suficiente: antes de entrar en la fase de replicación y dar lugar a células defectuosas, la célula *prefiere* abortar su desarrollo. Para comprender la respuesta a la tercera pregunta, es necesaria una aclaración previa. Las levaduras, además de la división asexual que se acaba de exponer, son capaces de seguir un proceso de reproducción sexual. Existen dos

tipos sexuales diferentes en *S. cerevisiae*, que se denominan  $\alpha$  y  $\alpha$ . Las células de cada uno de estos tipos son capaces de segregar un factor de apareamiento, que es reconocido específicamente por las células del tipo contrario. La presencia de un factor de apareamiento produce la detención del ciclo celular en “start” en las células del tipo contrario, de modo que cuando se encuentran células  $\alpha$  y  $\alpha$  el ciclo de ambas se detiene para dar lugar a que se produzca el apareamiento. Como consecuencia de la fusión del material genético de ambas células, resulta otra diploide que, tras un proceso de recombinación genética y meiosis dará lugar a cuatro esporas haploides, capaces de crecer y dividirse de forma asexual.

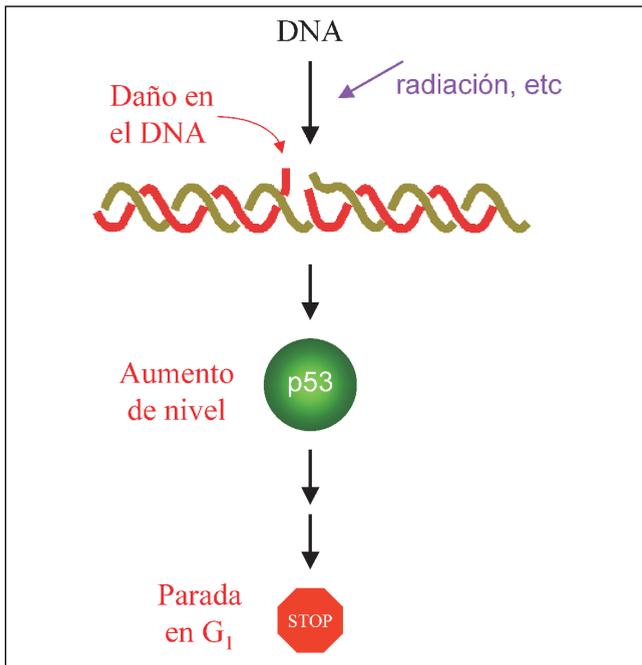
En el párrafo anterior se ha tratado el control del ciclo celular de levaduras de una manera un tanto antropomórfica. Se ha dicho que las células *se plantean* preguntas, que *optan* por detener su proliferación, que *prefieren* abortar su desarrollo. Aquí habría que reconsiderar, desde un punto de vista epistemológico, la cuestión del *por qué*, que se planteaba en la introducción. Por ejemplo, a la pregunta, ¿por qué se detiene en “start” el ciclo celular de *S. cerevisiae* cuando se encuentra en presencia de células del tipo contrario?, se podría responder: “porque la célula prefiere tomarse un tiempo para el apareamiento y aprovechar las ventajas genéticas que proporciona la reproducción sexual”. Pero esta respuesta, aunque ayude a comprender la lógica subyacente al fenómeno, no puede satisfacer a un biólogo. No da las causas materiales por las que la parada del ciclo se produce y es a esas causas a las que deben obedecer las células, incapaces del auténtico discernimiento y libertad de opción que tenemos los seres humanos. Con todo, ahora no se profundizará en estas causas; para nuestro objeto bastará con poner un ejemplo, más adelante, al tratar del control del ciclo celular en animales.

El estudio del ciclo celular de *S. cerevisiae* ha proporcionado muchas pistas para comprender los mecanismos de control que operan en diversos organismos, pero es el momento de centrarse definitivamente en el estudio de células animales. Además del punto de control próximo al final de  $G_1$ , que en células animales recibe el nombre de “punto de restricción” en vez de “start” y responde a situaciones diferentes que las vistas para levadura, hay otro punto de control al final

de  $G_2$  y otro antes de terminar la fase M. El control en  $G_2$  asegura que solamente comiencen la mitosis las células que tienen totalmente replicado y sin daños su DNA. La lógica de este punto de control es clara: si la replicación hubiera sido defectuosa o hubiera introducido daños en el DNA, esos defectos se transmitirían a la descendencia. Cuando la célula detecta alguno de esos defectos, el ciclo celular se detiene hasta que se reparan. El control en M garantiza que sólo cuando los cromosomas están correctamente alineados se produce su reparto entre las dos células resultantes de la mitosis. También es plenamente comprensible el porqué lógico de este control.

Al control que tiene lugar al final de  $G_1$  vale la pena dedicarle mayor atención. Es el que facilitará la comprensión del control de la proliferación celular y, además, el que nos permitirá adentrarnos, siquiera sea sucintamente, en el estudio de las causas moleculares por las que se produce. Este punto de restricción gobierna dos tipos de situaciones diferentes. Por un lado, detiene el ciclo celular cuando el DNA ha sufrido algún daño durante  $G_1$ . De esta manera, no se replica un DNA dañado y la célula puede proceder a su reparación. Por otra parte, en ese punto se toma la decisión trascendental de seguir el ciclo celular o entrar en  $G_0$ . Comenzará la revisión de estos mecanismos por el estudio de la parada provocada por daños en el DNA. Aunque implique dar un pequeño rodeo, esta manera de afrontar el problema tiene la ventaja de que permite comprender el mecanismo molecular por el que actúan los principales factores implicados en el control del ciclo celular.

Son muchas las causas que pueden dar lugar a daños en el DNA, entre las que se encuentran las radiaciones. Hace aún poco tiempo, concretamente en agosto de 2005, se cumplieron 60 años desde que el hombre utilizó por primera vez —y ojalá sea por última— la energía nuclear como medio masivo de destrucción y de muerte. La prensa se hizo oportunamente eco del insospechado incremento en las enfermedades cancerosas sufrido por los supervivientes iniciales de las bombas caídas sobre Hiroshima y Nagasaki. En un orden de cosas diferente, los medios de comunicación, especialmente durante la temporada estival, alertan de los riesgos de una exposición incontrolada a la radiación solar, por sus peligros como causa de cáncer de piel. Pues bien, en gran medida,



**Figura 4.** Parada del ciclo celular en el punto de restricción al final de  $G_1$ . Si, por efecto de la radiación o por otro motivo, se ha producido un daño en el DNA, se eleva el nivel de la proteína p53, lo que conduce a la detención del ciclo celular.

esta incidencia de alteraciones neoplásicas producida por las radiaciones se explica si se comprende el control del ciclo celular en  $G_1$ . La figura 4 muestra que la aparición de un daño en el DNA, por efecto de la radiación o por otros motivos, da lugar al aumento de la concentración de p53. Ésta es una proteína que, siguiendo una práctica habitual, se denominó así simplemente por tener un peso molecular próximo a 53.000 y desconocerse en el momento de su descubrimiento la función que desarrolla. Ahora se sabe que esta función es fundamental en el control del ciclo celular, ya que el aumento de nivel de p53 conduce a la parada del ciclo en la fase  $G_1$  tardía, como se esquematiza en la figura 4. Aunque el mecanismo por el que p53 detiene el ciclo se considerará más tarde, en este momento ya se puede comprender cómo la presencia de p53 funcional es imprescindible para que no se replique el DNA dañado. Gráficamente, se ha

llegado a llamar a la proteína p53 “protector del genoma” (3). Por eso, no sorprende que en una gran parte de tumores se encuentren diversas mutaciones en p53 (Tabla I). Efectivamente, si estando alterada la proteína p53 se produce un daño en el DNA, el ciclo celular no se detendrá en  $G_1$ , se replicará el DNA dañado en la fase S y el daño se perpetuará en la descendencia celular. No toda alteración de p53 es fatal, ya que el daño del DNA puede ser irrelevante. Pero si afecta a funciones clave, la conjunción de ambas causas, mutación en p53 y daño en el DNA, conduce a un proceso canceroso (4-7).

Ahora es el momento de rellenar la laguna que queda en el esquema de la figura 4 entre la elevación del nivel de p53 y la detención del ciclo celular. Pero para hacerlo, es preciso hablar previamente de otras proteínas, las ciclinas, que desempeñan un papel fundamental en el control del ciclo celular. Deben su nombre al hecho de que su concentración fluctúa cíclicamente a lo largo de las diversas fases del ciclo celular. Existen varias clases de ciclinas (4). Por ejemplo, las ciclinas B se sintetizan continuamente a partir de la fase S, con lo que su concentración aumenta gradualmente a lo largo de  $G_2$  y del inicio de la fase M. Pero, mediada esta fase, la concentración de ciclina B cae abruptamente. La causa es que se produce en ese momento una degradación proteolítica<sup>4</sup>, que destruye la ciclina. En las células resultantes de la subsiguiente división, se repite el proceso, de modo que, cíclicamente, la ciclina B aumenta de concentración a partir de S, pasa por un máximo en M y desaparece al final de esta fase. Se dice, pues, que las ciclinas B son ciclinas mitóticas, porque alcanzan su máxima concentración intracelular durante la mitosis. Hay también ciclinas que se acumulan al final de  $G_1$ , como las ciclinas E, o al final de  $G_2$ , como las ciclinas A.

El papel de las ciclinas es el de actuar como reguladoras de unas enzimas, con actividad de proteína quinasa<sup>5</sup>, que reciben por eso el nombre de quinasas

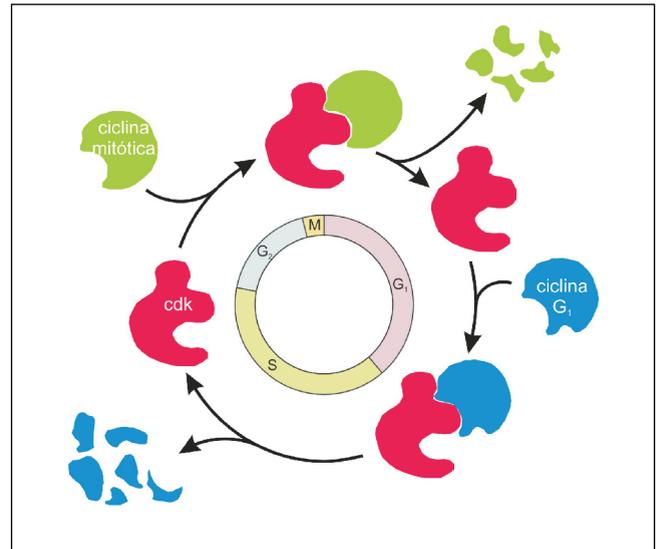
<sup>4</sup> La proteólisis es una hidrólisis controlada de diferentes proteínas. Son varios los mecanismos de proteólisis conocidos. Uno de los más corrientes, que es el que opera en el caso de las ciclinas, implica la unión previa de la proteína a degradar con la ubiquitina, una proteína pequeña muy conservada y presente en prácticamente todas las células. Los mecanismos de degradación proteolítica dependientes de ubiquitina fueron descubiertos por Irwin Rose, Aaron Ciechanover y Avram Hershko, que fueron galardonados por ello con el Premio Nobel de Química en 2004.

<sup>5</sup> Las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de fosfato desde el ATP a otro sustrato. En el caso de las proteína quinasas, ese otro sustrato es una proteína.

| TABLA I<br>Frecuencia de mutaciones en la proteína p53<br>en diversos tumores humanos |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Localización del tumor  | Incidencia (%) de mutaciones en p53 |
| Pulmón  | 56                                  |
| Colon   | 50                                  |
| Esófago   | 45                                  |
| Ovario  | 44                                  |
| Páncreas  | 44                                  |
| Piel  | 44                                  |
| Estómago  | 41                                  |
| Vejiga  | 34                                  |
| Próstata  | 30                                  |
| Mama  | 22                                  |

dependientes de ciclinas y que normalmente se designan con las siglas cdk<sup>6</sup>. Cuando se forma el complejo ciclina-cdk, la actividad quinasa de ésta última se activa. Por el contrario, cuando la ciclina se separa —como ocurre cuando se degrada por proteólisis— la quinasa es inactiva (4). En la figura 5 se observa, esquemáticamente, cómo una ciclina mitótica puede conseguir que la cdk correspondiente se encuentre activa durante la fase M, mientras que una ciclina G<sub>1</sub> activará a la cdk durante esa fase del ciclo celular. Pues bien, con estos antecedentes, ya estamos en situación de dar un paso más hacia la comprensión del mecanismo que culmina en la detención del ciclo en respuesta a la elevación de p53 producida por un daño en el DNA (Fig. 4).

Ocurre con frecuencia, sin embargo, que para descifrar una cuestión es preciso dar una serie de detalles que pueden producir la impresión de que, en vez de una aclararse, la cuestión se complica, hasta que al término de la exposición se hace la luz. Eso precisamente ocurre en el caso presente, en el que, para comprender el mecanismo por el cual actúa p53, es preciso complicar inicialmente la cuestión. La proteína p53, entre otras funciones, activa la transcripción del gen



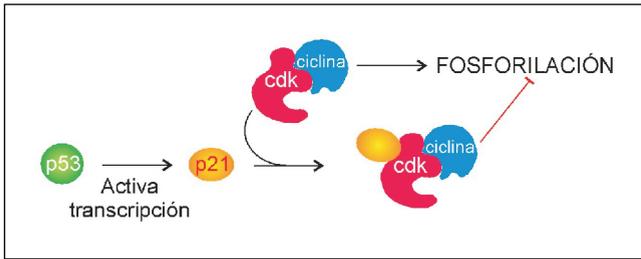
**Figura 5.** Actuación combinada de las ciclinas y de las quinasa dependientes de ellas. Las quinasa dependientes de ciclinas (cdk) sólo poseen actividad enzimática cuando forman un complejo con las ciclinas. Éstas se acumulan en determinados momentos del ciclo celular; en el esquema aparece una ciclina mitótica y otra que se acumula en G<sub>1</sub>. Pasada la fase correspondiente del ciclo celular, la degradación proteolítica conduce a la desaparición de la ciclina, con la consiguiente pérdida de actividad quinasa de la cdk.

que codifica otra proteína reguladora, la denominada p21 (5). Como se esquematiza en la figura 6, esta proteína es capaz de unirse al complejo cdk-ciclina, unión que da lugar a la inhibición de la actividad quinasa de cdk. De esta manera, una elevación del nivel de p53 se traduce en un aumento en la concentración de p21, con la consiguiente inhibición de las fosforilaciones catalizadas por el complejo formado por cdk y la ciclina G<sub>1</sub>. Pues bien, la diana principal de este complejo es la proteína pRb, denominada así porque se caracterizó inicialmente como supresor<sup>7</sup> en un caso de retinoblastoma<sup>8</sup>. No obstante, el papel de pRb no se limita al retinoblastoma, sino que actúa como supresor de un gran número de tumores (4). Aunque tiene varios modos de acción, el mecanismo de pRb que interesa en el contexto de este artículo es el de bloquear, por interacción con ellos, activadores transcripcionales de genes implicados en la progresión del ciclo celular (8). Como se aprecia en la figura 7, pRb forma un com-

<sup>6</sup> Iniciales tomadas del inglés *cyclin-dependent kinase*.

<sup>7</sup> Un supresor es una proteína que *frena* la proliferación de las células tumorales. Puede actuar por varios mecanismos, bien inhibiendo la progresión del ciclo celular, bien provocando la apoptosis. Es, quizá, más frecuente hablar de genes supresores, para referirse a los que codifican esas proteínas.

<sup>8</sup> El retinoblastoma es un tipo poco frecuente de cáncer pediátrico, que afecta las células de la retina.



**Figura 6.** Mecanismo de actuación de p53 en el punto de restricción  $G_1$ . La proteína p53 es un activador transcripcional del gen que codifica la proteína p21, que se une al complejo ciclina-cdk, inhibiendo la actividad quinasa de esta última.

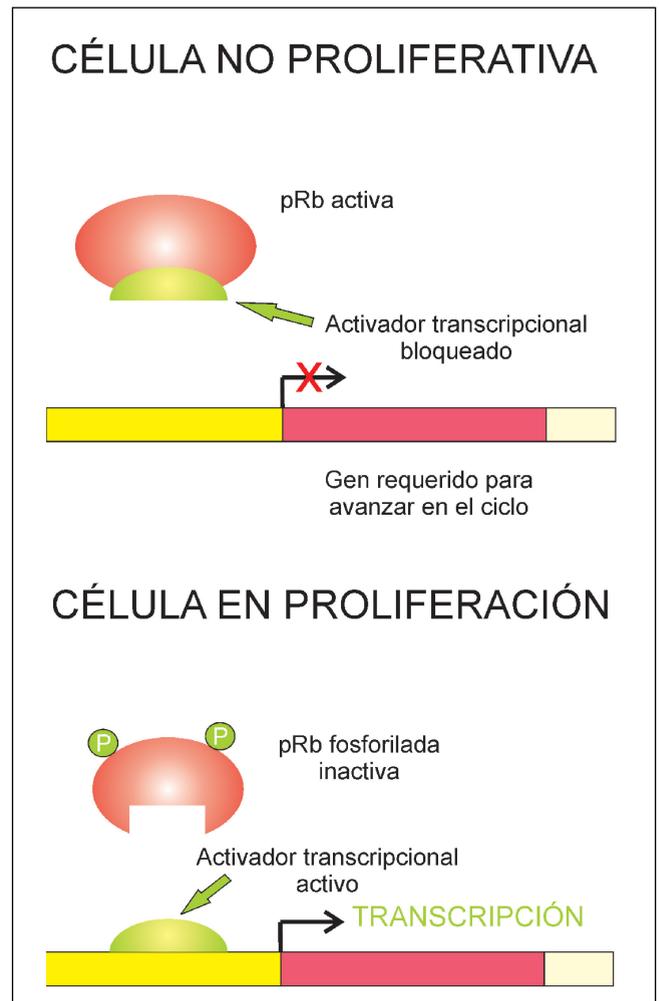
plejo que bloquea un activador transcripcional necesario para el funcionamiento del ciclo celular. Como consecuencia de la inactivación de ese factor, el ciclo se detiene y la célula no prolifera. Pero cuando pRb se fosforila por el complejo formado por cdk y la ciclina  $G_1$ , pierde su capacidad de secuestrar al factor transcripcional; éste se une al promotor de sus genes diana, la transcripción se produce y el ciclo celular se reanuda (9). Ahora ya puede comprenderse cómo un aumento de p53, que impide la fosforilación de pRb, produce una parada en el ciclo celular. Y también se comprende que si pRb, por una mutación o por alguna otra causa, pierde su funcionalidad el resultado sea el mismo que el de su fosforilación, es decir, la progresión incontrolada a lo largo del ciclo celular. Este es el motivo por el que pRb tiene una función de supresor de tumores, no sólo en el caso del retinoblastoma, y por eso son muy numerosos los tipos de cáncer humano en los que se ha detectado un fallo en pRb. Más adelante se verá otra implicación de estos mecanismos en la aparición de tumores, pero ahora hay que añadir que, además de pRb, otras proteínas análogas, como p107 o p130, pueden desempeñar papeles semejantes. Tradicionalmente se conocen las proteínas de esta familia como *pocket proteins*, proteínas de bolsillo.

## LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y LA PROGRESIÓN EN EL CICLO CELULAR

En los párrafos precedentes se ha comentado cómo puede detenerse la progresión de una célula a lo largo del ciclo cuando tal progresión puede representar un riesgo para la supervivencia. También se ha hablado de que, en un organismo pluricelular, se encuentran células que, habitualmente, no se dividen. Evidentemente, se trata de dos situaciones diferentes —la

detención temporal del ciclo en células que ordinariamente se dividen y la permanencia en un estado,  $G_0$ , de no proliferación—, que han de responder a mecanismos distintos. Para entender las relaciones entre  $G_0$  y  $G_1$  y cómo una célula puede pasar de un estado quiescente al ciclo celular o viceversa, es preciso considerar un nuevo tipo de moléculas: los factores de crecimiento.

En 1954, en una investigación que, finalmente, le valió la concesión del premio Nobel, Rita Levi-Montalcini descubrió una sustancia de naturaleza polipeptídica, que estimulaba el crecimiento y desarrollo de ciertas neuronas (10). Llamó a esta sustancia



**Figura 7.** Acción de la proteína de retinoblastoma, pRb. La forma activa de pRb (no fosforilada) bloquea la transcripción de los genes requeridos para la proliferación al interactuar con sus activadores transcripcionales. Cuando pRb se fosforila, es incapaz de combinarse con los activadores, que ya pueden ejercer su función. Como resultado, continúa el ciclo celular.

TABLA II  
Ejemplos de factores de crecimiento

| Factor de crecimiento   | Número de aminoácidos                            | Efectos   |
|---|--|---|
| Factor de crecimiento nervioso (NGF)                                    | 118  | Diferenciación y supervivencia de neuronas            |
| Factor de crecimiento epidérmico (EGF) <sup>1</sup>                     | 53   | Proliferación de muchos tipos celulares               |
| Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)                      | 125 (A) <sup>2</sup><br>109 (B)                  | Proliferación de fibroblastos y otros tipos celulares |
| Interleuquina-2   | 133  | Proliferación de linfocitos T                         |
| Eritropoietina  | 166  | Desarrollo de eritrocitos                             |
| Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)                              | 463 ( $\alpha$ ) <sup>3</sup><br>234 ( $\beta$ ) | Proliferación de hepatocitos y otros tipos celulares  |
| Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF $\beta$ ) <sup>4</sup> | -  | Múltiples   |

<sup>1</sup> El factor transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) pertenece a la misma familia que el EGF; comparten el mismo receptor y tienen muchas funciones comunes.

<sup>2</sup> Se dan los tamaños de las dos cadenas del factor maduro

<sup>3</sup> El profactor, de 728 aminoácidos, se procesa para dar un heterodímero, en el que las dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , quedan unidas mediante un puente disulfuro.

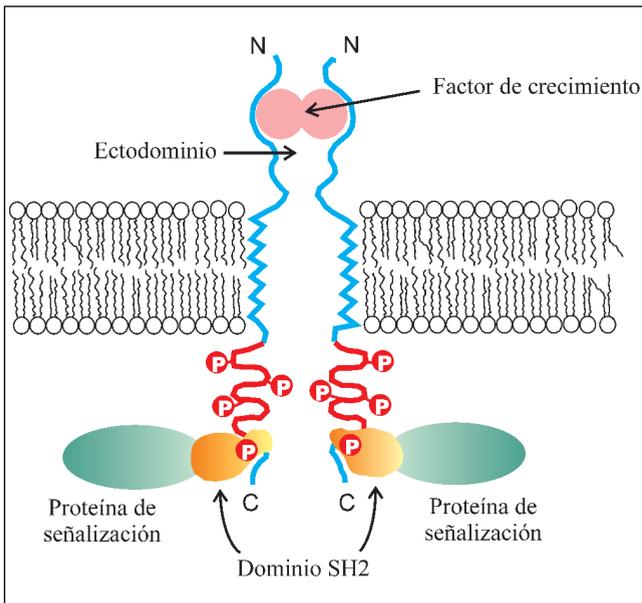
<sup>4</sup> Se trata de una familia de factores, estructuralmente relacionados, por lo que no puede hablarse de un único número de aminoácidos y funciones

*factor de crecimiento nervioso*, abreviadamente NGF (de *Nerve Growth Factor*). Al descubrimiento del NGF siguió, de una forma un tanto casual el del EGF (de *Epidermal Growth Factor*), factor de crecimiento epidérmico, como consecuencia del trabajo de Stanley Cohen (11). El EGF es también un polipéptido, de 53 aminoácidos, que ha llegado a constituir un caso paradigmático de la larga serie de factores, todos ellos de naturaleza polipeptídica, que controlan el crecimiento y diferenciación de células animales, tanto en el desarrollo embrionario como en los organismos adultos (Tabla II).

El papel crítico desempeñado por los factores de crecimiento en el control de la proliferación celular hace que las anomalías en su expresión o mecanismo de acción conduzca a diversas situaciones patológicas, entre otras, diversos tipos de cáncer. De hecho, el descubrimiento del NGF fue posible gracias a que Levi-Montalcini utilizó como material biológico de partida un tipo de tumor en el que se sobreexpresaba el factor. Por ese motivo, es lógico que, desde su descubrimiento, los factores de crecimiento atrajeran el interés de los investigadores para dilucidar su modo de actuación.

Como ocurre con todos los péptidos, los factores de crecimiento son incapaces de atravesar las membranas plasmáticas. Para actuar en las células diana, tienen que interaccionar con un receptor, que es una proteína integral de la membrana plasmática de esas células. El receptor del EGF fue el primero en ser estudiado con detalle y gran parte del conocimiento que se tiene sobre los receptores de factores de crecimiento se debe precisamente a los trabajos realizados con él (12).

La mayoría de los receptores de factores de crecimiento poseen actividad enzimática de tirosina quinasa (13), es decir, catalizan la fosforilación de residuos de tirosina en sus proteínas sustrato. Esa actividad catalítica se encuentra en un dominio intracelular del receptor, mientras que, como es obvio, el sitio de unión del factor de crecimiento está situado en el dominio externo, que corresponde a su región N-terminal, y suele conocerse como *ectodominio*. Ambos dominios están conectados por un único segmento transmembrana de hélice  $\alpha$ . Las investigaciones iniciales revelaron dos acontecimientos que ocurren tras la unión del factor de crecimiento: la dimerización del receptor y un notable incremento de su actividad tirosina quinasa. Aunque la dimerización puede ocurrir



**Figura 8.** Esquema de un receptor de factores de crecimiento. Se muestra un receptor dimerizado como consecuencia de la unión del factor de crecimiento al sitio específico en el ectodominio, o dominio extracelular. Como consecuencia de esa interacción, el dominio intracelular (en rojo), conectado con el ectodominio a través de una hélice transmembrana (en azul) adquiere actividad de tirosina quinasa, que produce la autofosforilación del dominio intracelular del receptor, aumentando así la actividad quinasa, que puede fosforilar proteínas de señalización, iniciando así una cascada de transducción de la señal.

en algunos casos en ausencia del factor de crecimiento, el incremento de la actividad quinasa es estrictamente dependiente de su unión. Esta conjunción de dimerización e incremento de la actividad de tirosina quinasa hace posible la autofosforilación del receptor en *trans*, es decir, cada una de las subunidades fosforila residuos de tirosina de la otra (Fig. 8). A su vez, la autofosforilación desempeña un papel fundamental en el funcionamiento de estos receptores. En primer lugar, tiene una función reguladora de la propia actividad tirosina quinasa del receptor. Por otro lado, la fosforilación de residuos de tirosina situados fuera del centro activo, en un cuarto dominio que se encuentra en el extremo C-terminal del receptor, hace que esta región del receptor adquiera la capacidad de unirse a otras proteínas citoplasmáticas.

Las consecuencias funcionales de la unión de otras proteínas celulares es determinante para que la transducción de la señal iniciada por la asociación del factor de crecimiento con su receptor se lleve a término. Entre las proteínas reclutadas por el receptor de EFG, por ejemplo, se encuentran proteínas que participan directamente en rutas de señalización celular, como quinasas y fosfatasa<sup>9</sup> (14-16). La formación de un complejo con el receptor (Fig. 8) incrementa la actividad de estas enzimas, que inician de ese modo una cascada de fosforilación-desfosforilación<sup>10</sup> hasta llegar al destino final intracelular. Pero hay que tener en cuenta que ese destino ha de ser el material genético. En efecto, si los factores de crecimiento inducen la proliferación de células eucarióticas, parece claro que la señal mitogénica<sup>11</sup>, iniciada en el receptor, ha de llegar hasta el DNA. Esto es así, no sólo porque el DNA haya de replicarse para que las células se dividan, sino porque el crecimiento y la diferenciación implican la transcripción de múltiples genes que controlan la progresión del ciclo celular. Entre estos genes, hay algunos que se activan a los pocos minutos de haberse recibido la señal mitogénica, por lo que reciben el nombre de genes *inmediato-tempranos*. Normalmente, estos genes codifican factores de transcripción, necesarios para la activación de otra serie de genes, a veces llamados *retrasados*, porque, como es obvio, su expresión es posterior a la de los genes inmediato-tempranos. Y estos genes retrasados suelen codificar otros factores necesarios para que los genes directamente implicados en la progresión del ciclo celular se expresen.

Resumiendo, tras la interacción del factor de crecimiento con su receptor, se inicia una cascada de fosforilación cuya diana final puede ser —ya en el núcleo— un factor transcripcional, un componente de la cromatina o un complejo que la modifique (2). En cualquier caso, se trata de algo que puede dar lugar a una transcripción específicamente regulada de uno o varios genes inmediato-tempranos. La cascada continúa, ya que, como se ha apuntado antes, los productos de los genes inmediato tempranos son de

<sup>9</sup> Las fosfatasa catalizan la hidrólisis de ésteres fosfóricos. Su acción, pues, se opone a la de las quinasas y la conjunción de ambos tipos de enzimas es precisa para que la señal introducida por la fosforilación sea reversible.

<sup>10</sup> La naturaleza de las cascadas de fosforilación y su importancia en la transducción de señales se han tratado en otra edición de este Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica (17).

<sup>11</sup> En general, recibe el nombre de mitógeno toda sustancia que favorece la división mitótica de la célula sobre la que actúa.

ordinario factores transcripcionales que activan en cadena la expresión de otros genes hasta llegar a la activación de los genes requeridos para la proliferación celular. El panorama, pues, es sumamente complejo y la complejidad se hace mayor si se tiene en cuenta que existen, al menos, seis rutas de MAP<sup>12</sup> quinasas, que no son lineales, es decir que no tienen un único receptor como comienzo ni una sola diana nuclear como final. En algunos casos, hay redundancia entre las rutas de señalización y, muy frecuentemente, existe una intercomunicación entre ellas. Como acertadamente ha apuntado Gilbert, «estas rutas son simplemente las carreteras principales del flujo de información. Entre ellas, hay avenidas y calles que conectan una carretera con otra» (18).

En este momento, conviene recordar que toda la aparente disgresión anterior sobre los factores de crecimiento estaba motivada por el propósito de entender cómo una célula puede pasar de un estado quiescente, G<sub>0</sub>, al ciclo celular o viceversa. Pues bien, en las células animales, además de todos los mecanismos ya comentados que existen para detener el ciclo celular en G<sub>1</sub>, la salida del ciclo y el paso a G<sub>0</sub> (véase la figura 2) se induce por la ausencia de factores de crecimiento. Al contrario, cuando sobre una célula actúan los factores de crecimiento adecuados, se favorece la progresión del ciclo celular. Un caso paradigmático es el de la regeneración de la piel tras una herida. Es bien sabido que las plaquetas juegan un papel fundamental en la coagulación de la sangre, pero, además, estas células anucleadas segregan un factor de crecimiento, el PDGF (*platelet-derived growth factor*, véase tabla II), que estimula la proliferación de los fibroblastos, con la consiguiente regeneración de la piel. El PDGF resulta así decisivo para el retorno al ciclo celular de los fibroblastos. En los mecanismos subyacentes juega un papel importante la proteína pRb, lo que explica que una malfunción de dicha proteína produzca una proliferación celular incontrolada. Esta circunstancia, unida a su papel en la detención del ciclo celular en respuesta a daños en el DNA justifica sobradamente la importancia de pRb en los mecanismos oncogénicos.

## LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Como ya se ha mencionado, las células hepáticas ordinariamente se encuentran en G<sub>0</sub>. Menos del 0,01% de los hepatocitos se pueden observar en mitosis (19), pero pueden comenzar a proliferar en respuesta a determinados estímulos. Desde hace bastante tiempo se sabe que la hepatectomía parcial, resección quirúrgica de parte del hígado, constituye uno de esos estímulos (20). A un animal de experimentación se le pueden extirpar hasta las dos terceras partes del hígado y el tercio restante resulta capaz de regenerar —en pocos días— la masa total del hígado. Esta circunstancia hace inevitable pensar en el mito de Prometeo, que robó el fuego sagrado para regalárselo a los hombres y, con esa acción y otras parecidas, se ganó la enemistad de Zeus. Éste le castigó a permanecer encadenado a una roca, para que un águila le devorara el hígado. Pero esa víscera se regeneraba constantemente, con lo que el órgano no tenía fin. ¿Sabía Hesíodo, que describe el mito en su *Teogonía*, que el hígado es capaz de regenerarse? Seguramente no, pero en cualquier caso, se trata de una situación real.

Tras la eliminación parcial del hígado, las células restantes comienzan un programa regulado de proliferación. Aunque —como en casi todos los órganos—, en el hígado existen células troncales, no son éstas las responsables de la regeneración, que implica fundamentalmente la división de los hepatocitos (21). Cada uno de ellos es capaz de dividirse una o dos veces; en ratas, los hepatocitos comienzan a entrar en fase S unas 14 h tras la hepatectomía parcial y llegan al máximo de síntesis de DNA a las 24 h. La primera división celular, bastante sincronizada, tiene lugar algunas horas más tarde. La segunda ronda de división, que ya no ocurre en todas las células, de una forma menos sincronizada, entre 3 y 5 días y, al cabo de unos 12 días, el hígado ha recuperado su tamaño original y su función (19). Este programa de regeneración tiene lugar en todas las especies, aunque el desarrollo temporal varía de unas a otras y es, en cualquier caso, más lento que en la rata.

<sup>12</sup> Reciben el nombre de MAP (*mitogen-activated protein*) quinasas las enzimas citoplasmáticas destinatarias de la señalización, últimos eslabones de la cadena que comienza aguas arriba en la proteína que se une al receptor una vez autofosforilado, y que se encargan de introducir la señal en el núcleo.

La regeneración hepática implica dos acontecimientos fundamentales. El primero es el paso de los hepatocitos de  $G_0$  a  $G_1$ ; el segundo es la progresión de las células desde  $G_1$  a lo largo del ciclo celular. Con lo que ya se ha considerado, no llama la atención advertir que hay factores de crecimiento, especialmente HGF y  $TGF\alpha$ , responsables de la entrada de los hepatocitos en la fase S. Pero estos factores son incapaces de conseguir que los hepatocitos quiescentes abandonen este estado para pasar a  $G_1$  (21). Esta transición, que se puede denominar “cebado”<sup>13</sup>, es, posiblemente, el hecho decisivo en la regeneración hepática. Las citoquinas, especialmente TNF e  $IL-6$ <sup>14</sup>, son las moléculas que, tras la agresión producida por la hepatectomía, disparan la producción de los radicales libres conocidos genéricamente como especies reactivas de oxígeno que, a su vez, a través de una compleja cascada de acontecimientos que incluye fosforilaciones, proteólisis, etc., da lugar, antes de 30 min tras la hepatectomía, a la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B. Como consecuencia, se activa la transcripción de los genes inmediato-tempranos (21), entre los que se encuentran los de los protooncogenes *c-Myc* y *c-Fos* (Fig. 9).

No es extraño que, tanto por el conjunto de fenómenos que ocurren tras la hepatectomía parcial, como por la relativa facilidad experimental con la que puede producirse, la regeneración hepática se haya utilizado frecuentemente como un modelo de proliferación celular. Fundamentalmente, se ha empleado para estudiar la transición  $G_1$ -S, etapa en la que el secuestro de las proteínas de bolsillo por Id2<sup>15</sup> impide su acción antiproliferativa. En efecto, si se vuelve a observar la figura 7, se advertirá que al impedir la acción de la forma hipofosforilada de pRb —o de otra proteína de la familia— por su unión con Id2, se está contrarrestando el papel de las proteínas de bolsillo en la detención del ciclo celular. La acción de Id2 mimetiza en cierto sentido la fosforilación de las proteínas de la familia de pRb y permite la transición  $G_1$ -S (22). La

figura 9 muestra algunos ejemplos de los genes que se activan durante esta transición y en todos estos casos el bloqueo de la acción de las proteínas de bolsillo parece esencial.

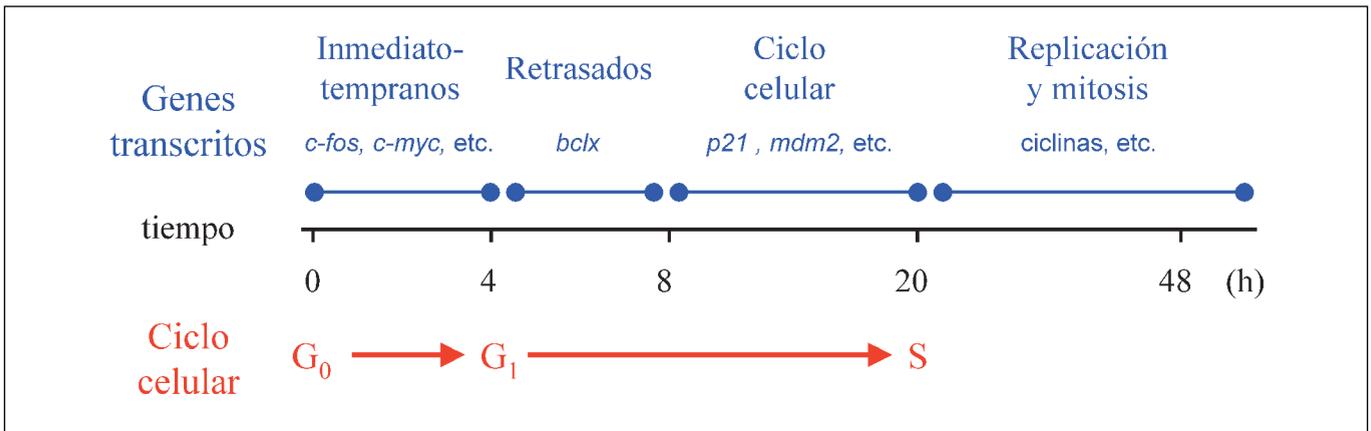
Pero comparativamente, se sabe mucho menos de los acontecimientos que tienen lugar durante el cebado de los hepatocitos. Aunque, como se ha comentado antes, se conoce la participación de las citoquinas y se han identificado los genes inmediato-tempranos que se inducen durante la transición  $G_0$ - $G_1$ , los mecanismos moleculares íntimos por los que la activación de estos genes tiene lugar presentan aún numerosos interrogantes. Hay que señalar que se trata de un problema digno de estudio, toda vez que el cebado es fase determinante del inicio de la proliferación de células quiescentes. Puesto que las transformaciones neoplásicas implican precisamente un inicio de la proliferación de células que ordinariamente se encuentran en  $G_0$ , cobra interés adquirir conocimientos sobre los mecanismos implicados en esa transición. En nuestro laboratorio, dedicado al estudio de las relaciones entre estructura de la cromatina y la actividad transcripcional, nos hemos interesado por este problema de la transición  $G_0$ - $G_1$ , teniendo en cuenta que los mecanismos de activación génica no pueden contemplarse fuera del contexto estructural de los genes.

Cuando emprendimos esta investigación, nos centramos fundamentalmente en la activación de *c-Myc*. Además de los datos que sucintamente se han mencionado más arriba, se sabía que la represión de este gen —al menos en queratinocitos— estaba causada por la formación de un complejo entre la proteína de bolsillo p107 y un regulador transcripcional de la familia E2F (23). La represión mediada por proteínas de bolsillo está asociada a la desacetilación de histonas, ya que estas proteínas, en su estado desfosforilado, reclutan complejos de histona desacetilasas (24-26). De esta forma se confirma la estrecha relación que existe entre regulación génica y estructura de la

<sup>13</sup> Este proceso, que en la literatura anglosajona se define como *priming*, puede describirse adecuadamente en castellano en la forma que se recoge en el texto. En efecto, una de las acepciones que recoge el DRAE para cebar es «poner una máquina o un aparato en condiciones de funcionar».

<sup>14</sup> Reciben el nombre de citoquinas un conjunto de polipéptidos producidos por múltiples tipos celulares, que actúan como reguladores de ciertas respuestas biológicas, como la inflamación, la respuesta inmune, etc., a determinados estímulos. El TNF (de *tumour necrosis factor*) y las interleuquinas (IL) son dos de las citoquinas más representativas.

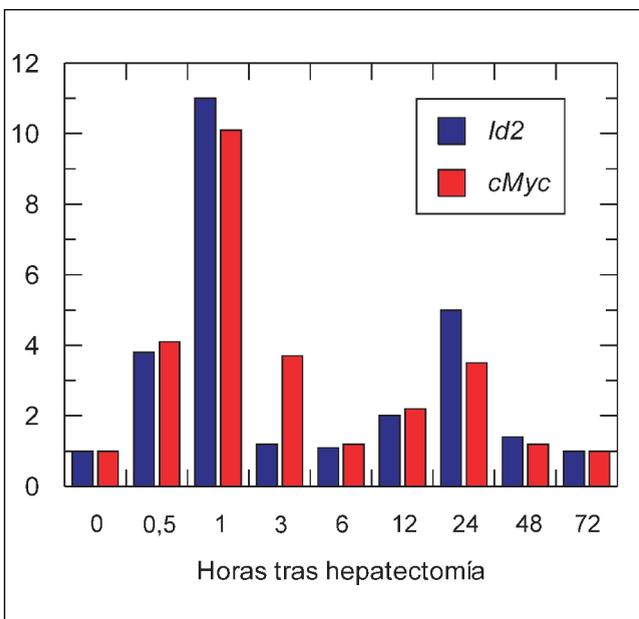
<sup>15</sup> Las proteínas Id (inhibidoras de la diferenciación), de las que existen 4 formas designadas con números correlativos, tienen un modo de acción complejo que, en último término, favorece la proliferación celular.



**Figura 9.** Secuencia inicial de acontecimientos en la regeneración hepática tras hepatectomía parcial. El 0 de la escala de tiempo corresponde al momento de la resección quirúrgica de las dos terceras partes del hígado de una rata. Por encima de la escala de tiempo, aparecen los genes más representativos de los transcritos en esos periodos y se indica algún comentario sobre su función. En rojo, debajo de la escala, se indican las fases del ciclo celular de los hepatocitos.

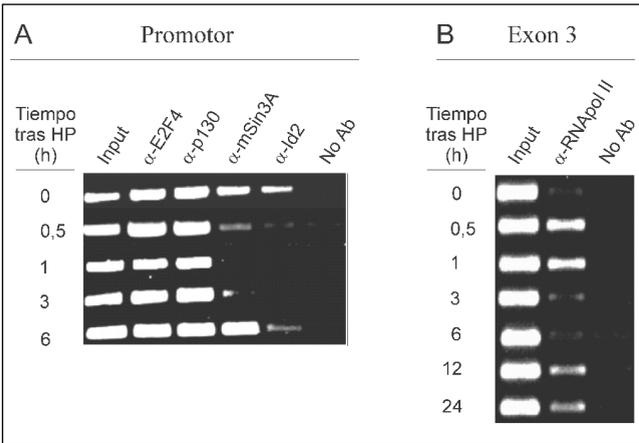
cromatina, relación que llevó a nuestro grupo a profundizar en el mecanismo de la activación de *c-Myc* durante el cebado de los hepatocitos tras hepatectomía parcial.

En primer lugar, se analizó, mediante la técnica de RNAPol ChIP, originalmente descrita en nuestro laboratorio (27), el nivel de expresión del gen *Id2* en comparación con el de *c-Myc*, para comprobar que ambos



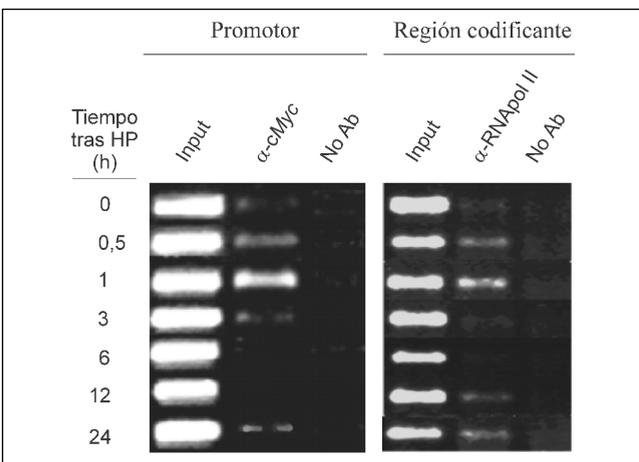
**Figura 10.** Transcripción de los genes *c-Myc* e *Id2* durante la regeneración hepática en rata. La tasa de transcripción se ha determinado mediante PCR cuantitativa a partir de un experimento de RNAPol ChIP. Adaptado de Rodríguez *et al.* (28).

genes siguen una pauta de activación bifásica (Fig. 10). Los dos genes se comportan como inmediato-tempranos, puesto que se observa un pico de transcripción 1 h tras la hepatectomía parcial, pero además, la transcripción se reanuda posteriormente, alcanzando otro máximo a las 24 h, coincidiendo con la primera fase S. Por las razones explicadas antes, centramos la atención en el primer máximo de transcripción, ya que el mecanismo del segundo ha sido estudiado por otros autores. La presencia de diversos factores en el promotor de *c-Myc* se analizó mediante la técnica de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*). Brevemente, esta técnica consiste en inmunoprecipitar fragmentos pequeños de cromatina, obtenidos por sonicación, con anticuerpos frente a los factores investigados. Si se quiere detectar si esos factores están presentes en una región concreta del genoma —el promotor de *c-Myc* en el caso presente—, el DNA contenido en el inmunoprecipitado se somete a PCR con oligonucleótidos adecuados para amplificar esa región. La cantidad de DNA amplificado tras la PCR indica, pues, la mayor o menor presencia del factor en el amplicón, la región abarcada por los oligonucleótidos empleados en la PCR. La figura 11 muestra que E2F4 y p130 se encuentran presentes en el promotor de *c-Myc* a lo largo de las 6 primeras horas tras la hepatectomía parcial. Sin embargo, la comparación de los resultados con los del experimento de RNAPol ChIP (Figs.10 y 11B) permite concluir que *Id2*, que se encuentra también presente en el hígado quiescente, abandona el promotor cuando el gen *c-Myc* se activa. Es significativo que en ese primer pico de actividad de *c-Myc*

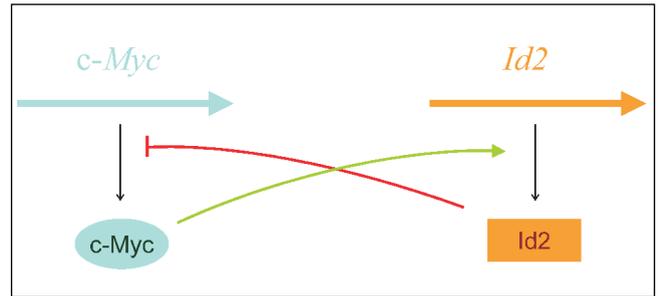


**Figura 11.** Análisis de la transcripción del gen *c-Myc* durante la regeneración hepática en rata. **A.** Ocupación del promotor por diversos factores: E2F4, p130, mSin3A e Id2. Se ha utilizado el método ChIP, con los anticuerpos de esos factores. La carrera marcada "No Ab" es un control en el que se ha omitido el anticuerpo en la inmunoprecipitación. La carrera "Input" recoge el total de los fragmentos de cromatina sin inmunoprecipitar. **B.** Análisis de la transcripción del gen en tiempo real mediante el método RNAPol ChIP (27). Se detecta la presencia de RNA polimerasa II en una zona codificante alejada del promotor. Se indica en cada caso el tiempo tras la hepatectomía parcial (HP). La figura corresponde a una adaptación a partir del artículo de Rodríguez *et al.* (28).

también abandone el promotor la proteína mSin3A, componente de un complejo represor que contiene histona desacetilasas, lo que pone de manifiesto la implicación de cambios en la cromatina en conexión con la activación transcripcional. Lo que resulta



**Figura 12.** Análisis de la transcripción del gen *Id2* durante la regeneración hepática en rata. El experimento es similar al recogido en la figura 11, pero se ha centrado en la presencia de la proteína *c-Myc* en el promotor de *Id2*, en relación con la transcripción de este gen (analizada por RNAPol ChIP en el panel de la derecha).



**Figura 13.** Hipótesis sobre la existencia de un lazo autorregulador entre los genes *c-Myc* e *Id2* durante el cebado de los hepatocitos en la regeneración hepática. Se propone que la proteína *c-Myc* actúa como activador del gen *Id2*, mientras que el producto de éste, la proteína *Id2* es un represor del gen *c-Myc*.

peculiar en este caso es que *Id2* y el complejo represor abandonen la cromatina con independencia de p130, ya que, hasta ahora, los mecanismos estudiados en los que se produce una salida de *Id2* y de los represores, implican, como ocurre en el segundo pico de expresión de *c-Myc* la simultánea salida de las proteínas de bolsillo.

Para concluir, vale la pena mostrar el análisis paralelo, también realizado por ChIP, del promotor del gen que codifica *Id2*. Puede observarse en la figura 12 que la proteína *c-Myc* se une al promotor de *Id2* precisamente cuando este gen está en transcripción. Así pues, los datos obtenidos sugieren que *Id2* reprime la transcripción de *c-Myc*, mientras que *c-Myc* activa la de *Id2*. Este posible lazo de regulación (figura 13), que nuestro grupo ha propuesto por primera vez (28), justificaría el carácter transitorio y autorregulado de la expresión de ambos genes durante el cebado de los hepatocitos para la regeneración hepática. El estudio de la regeneración hepática, como modelo de proliferación celular, ha sido capaz de proporcionar de esta manera datos para comprender el inicio de este proceso, que tan decisiva importancia puede tener en numerosas situaciones patológicas.

### CONCLUSIÓN

A lo largo de las líneas precedentes, se ha revisado sucintamente el complejo fenómeno de la proliferación celular y se han analizado algunas de sus causas moleculares. El hecho de que el hombre esté siendo capaz de descifrar estos intrincados mecanismos es un

motivo de optimismo y confianza en la capacidad de la mente humana para dar una respuesta a muchos interrogantes que se plantea la humanidad. El científico puede y debe ser optimista, pero tiene un importante deber cara a la sociedad y cuando se plantea la pregunta de si ese optimismo implica que las ciencias experimentales puedan satisfacer todas las ansias del pensamiento humano, no puede responder a la ligera, sin una seria reflexión sobre los límites del conocimiento científico. La mutua interdependencia de las ciencias experimentales con otras áreas del saber, como la filosofía, puede ayudar a superar tanto la irreflexiva autosuficiencia, como el pesimismo existencial.

Por otro lado, el hecho de que nuestro conocimiento avance cada vez más no debe ahogar la capacidad de asombro con la que el hombre se asoma a los fenómenos de la naturaleza. Decía Einstein que el estudio y, en general, la búsqueda de la verdad y de la belleza, son los campos en los que podemos seguir siendo niños toda la vida. Un niño tiene intacta su aptitud para el asombro y su despertar a la vida es una sucesión de pequeños descubrimientos que hacen de cada día una auténtica aventura irrepitable. Si el científico es capaz de adoptar esa postura, huyendo de la autosuficiencia, se encontrará en condiciones óptimas para avanzar por el camino de la investigación.

Finalmente, las líneas precedentes muestran que ante un proceso biológico complejo, como el de la proliferación celular, caben dos actitudes: o bien se consideran todos esos mecanismos como un insufrible enredo —como podría hacer un mal estudiante que pretendiera memorizarlos sólo para superar un examen a la antigua usanza—, o bien se contempla como una muestra más de la belleza de la naturaleza. García Lorca decía que un alma de poeta intenta descubrir el misterio que tienen todas las cosas. Bien se puede decir que un científico dotado de *alma de poeta* está en inmejorables condiciones para enfrentarse a los complejos problemas que la ciencia le plantea.

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. MUNICIO, A. M. (1980) «Ciencia y Aristobiología», Discurso inaugural del curso 1980–81. Real

Academia de Ciencias, Madrid.

2. FRANCO, L. (2003) «Doble hélice, genes y cromosomas» *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)* **97**, 203–222.
3. LANE, D. P. (1992) «p53, guardian of the genome» *Nature* **358**, 15–16.
4. BORRIELLO, A., ROBERTO, R., DELLA RAGIONE, F. Y IOLASCON, A. (2002) «Proliferate and survive: cell division cycle and apoptosis in human neuroblastoma» *Haematologica* **87**, 196–214.
5. VOGELSTEIN, B., LANE, D. Y LEVINE, A. J. (2000) «Surfing the p53 network» *Nature* **408**, 307–400.
6. KASTAN, M. B. Y BARTEK, J. (2004) «Cell-cycle checkpoints and cancer» *Nature* **432**, 316–323.
7. MASSAGUÉ, J. (2004) «G1 cell-cycle control and cancer» *Nature* **432**, 298–306.
8. KASTEN, M. M. Y GIORDANO, A. (1998) «pRb and the cdk's in apoptosis and the cell cycle» *Cell Death Differ.* **5**, 132–140.
9. MITTNACHT, S. (1998) «Control of pRb phosphorylation» *Curr. Opin. Genet. Develop.* **8**, 21–27.
10. LEVI-MONTALCINI, R. (1993) «The nerve growth factor: thirty-five years later», en *Nobel Lectures, Physiology and Medicine 1981-1990*, World Scientific Publishing Co., Singapore.
11. COHEN, S. Y ELLIOTT, G. A. (1963) «The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse» *J. Invest. Dermatol.* **40**, 1–5.
12. JORISSEN, R. N., WALKER, F., POULIOT, N., GARRETT, T. P. J., WARD, C. W. Y BURGESS, A. W. (2003) «Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling» *Exptl. Cell Res.* **284**, 31–53.
13. GSCHWIND, A., FISCHER, O. M. Y ULLRICH, A. (2004) «The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy» *Nat. Rev. Cancer* **4**, 361–370.
14. ZHU, G., DECKER, S. J., MACLEAN, D., MCNAMARA, D. J., SINGH, J., SAWYER, T. K. Y SALTIEL, A. R. (1994) «Sequence specificity in the recognition of the epidermal growth factor receptor by the abl Src homology 2 domain» *Oncogene* **9**, 1379–1385.
15. STOVER, D. R., BECKER, M., LIEBETANZ, J. Y LYDON, N. B. (1995) «Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha» *J. Biol. Chem.* **270**, 15591–15597.
16. MILARSKI, K. L., ZHU, G., PEARL, C. G., MCNAMARA, D. J., DOBRUSIN, E. M., MACLEAN, D., THIEME-SEFLER, A., ZHANG, Z. Y., SAWYER, T. Y DECKER, S. J. (1993) «Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B» *J. Biol. Chem.* **268**, 23634–23639.
17. MUNICIO, A. M. (2000) «Medicamentos viejos para

- enfermedades nuevas», en Horizontes Culturales (Real Academia de Ciencias), pp. 53-79, Espasa, Madrid.
18. GILBERT, S. F. (2000) *Developmental Biology*, 6th ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. U. S. A.
  19. KONIARIS, L. G., MCKILLOP, I. H., SCHWARTZ, S. I. Y ZIMMERS, T. A. (2003) «Liver regeneration» *J. Am. Coll. Surg.* **197**, 634–659.
  20. HIGGINS, G. M. Y ANDERSON, R. M. (1931) «Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following surgical removal» *Arch. Path.* **12**, 186–202.
  21. FAUSTO, N. (2000) «Liver regeneration» *J. Hepatol.* **32 (Supp. 1)**, 19–31.
  22. ZEBEDEE, Z. Y HARA, E. (2001) «Id proteins in cell cycle control and cellular senescence» *Oncogene* **20**, 8317–8325.
  23. IAVARONE, A. Y MASSAGUÉ, J. (1999) «E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor  $\beta$  repression of *cdc25A* during keratinocyte cell cycle arrest» *Mol. Cell. Biol.* **19**, 916–922.
  24. BREHM, A., MISKA, E. A., MCCANCE, D. J., REID, J. L., BANNISTER, A. J. Y KOUZARIDES, T. (1998) «Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription» *Nature* **391**, 597–601.
  25. LUO, R. X., POSTIGO, A. A. Y DEAN, D. C. (1998) «Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription» *Cell* **92**, 463–473.
  26. MAGNAGHI-JAULIN, L., GROISMAN, R., NAGUIBNEVA, I., ROBIN, P., LORAIN, S., LE VILLAIN, J. P., TROALEN, F., TROUCHE, D. Y HAREL-BELLAN, A. (1998) «Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase» *Nature* **391**, 601–605.
  27. SANDOVAL, J., RODRÍGUEZ, J. L., TUR, G., SERVIDDIO, G., PEREDA, J., BOUKABA, A., SASTRE, J., TORRES, L., FRANCO, L. Y LÓPEZ-RODAS, G. (2004) «RNApol ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription» *Nucleic Acids Res.* **32**, e88.
  28. RODRÍGUEZ, J. L., SANDOVAL, J., SERVIDDIO, G., SASTRE, J., MORANTE, M., PERRELLI, M.-G., MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L., VIÑA, J., VIÑA, J. R., MATO, J. M., ÁVILA, M. A., FRANCO, L., LÓPEZ-RODAS, G. Y TORRES, L. (2006) «Id2 leaves the chromatin of the E2F4–p130-controlled *c-myc* promoter during hepatocyte priming for liver regeneration» *Biochem. J.* **398**, 431–437.