



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Reproducción y diferenciación estructural del hepatocito de pollo durante el desarrollo embrionario

Jordi Domingo i Feliudabaló



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

"Reproducción y diferenciación estructural del
hepatocito de pollo durante el desarrollo embrionario"

TESIS DOCTORAL

Jorge Domingo Feliubadaló

Septiembre de 1982

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700389255

"Enteniment, llengua i ulls,
orelles i cor, els ha donat, perquè pensessin
Els ha omplert de capacitat per a conèixer,
els ha fet veure el bé i el mal.
Els ha posat al cor un ull diví,
perquè vegin la grandesa de les seves obres;"

Ecli 17, 6-8

als meus pares

a Carmina i Josep Oriol

Agradezco cordialmente al Prof. Dr. Diego Ribas Mujal la confianza, comprensión, amabilidad y apoyo con que siempre me ha honrado.

Lo mismo debo decir de los demás miembros del departamento y, muy especialmente, del grupo de reproducción celular que colaboraron en algunos experimentos de esta tesis y que ahora continúan investigando en diversas líneas con una dedicación seria e ilusionada que constituye para mí el mejor estímulo.

A todos, muchas gracias.

INDICE

1.	<u>Introducción</u>	1
1.1.	Sobre la reproducción celular	2
1.2.	Sobre la reproducción y diferenciación hepatocelulares	8
1.3.	Fundamentos y objetivos de la tesis	10
2.	<u>Reproducción celular</u>	14
2.1.	<u>El ciclo celular : Métodos de estudio</u>	15
2.1.1.	Objetivos del análisis del ciclo celular	15
2.1.2.	La población celular	19
2.1.3.	<u>Métodos de análisis cinético del ciclo celular</u>	25
2.1.3.1.	Mediciones sobre una sola célula aislada a lo largo de su ciclo	25
2.1.3.2.	Medición del crecimiento de la población	25
2.1.3.3.	Medición de frecuencias de fase	27
2.1.3.4.	Método del bloqueo mitótico	30
2.1.3.5.	Método de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM). Comparación crítica con el método del bloqueo mitótico	
2.1.4.	<u>Métodos de análisis secuencial del ciclo celular</u>	44
2.1.4.1.	Mediciones celulares individuales	44
2.1.4.2.	Mediciones sobre poblaciones sincronizadas	46
2.1.4.3.	Utilización de poblaciones asincrónicas para el análisis secuencial	48
2.1.4.4.	Utilización de métodos de bloqueo y de mutantes condicionales del ciclo celular para la determinación de puntos de transición	50

2.2.	<u>El intervalo G_1 —</u>	53
2.3.	<u>El modelo de probabilidad de transición y otros modelos estocásticos del ciclo celular</u>	70
2.3.1.	Introducción comparativa de las diferentes aproximaciones estadísticas al ciclo celular	70
2.3.2.	Modelos estadísticos para la interpretación de la FLM	72
2.3.3.	El modelo del G_0 o de probabilidad de transición : hipótesis y parámetros, curvas alfa y beta	77
2.3.4.	Interpretación de la FLM por el modelo de probabilidad de transición; determinación de la constante de velocidad en función de la constante de proliferación y de la duración de la fase B	84
2.3.5.	Discusión comparativa sobre el modelo de probabilidad de transición y otros modelos del ciclo celular	91
2.4.	<u>El intervalo S</u>	100
2.4.1.	Generalidades	100
2.4.2.	Iniciación del intervalo S y su posible relación con la membrana celular en las bacterias y con la envoltura nuclear en los eucariotas	100
2.4.3.	El sistema enzimático de la replicación del DNA	103
2.4.4.	Patrón de replicación cromosómica	109
2.4.5.	Síntesis e incorporación al cromosoma de los componentes proteicos	113
2.5.	<u>El intervalo G_2 y la división celular</u>	118
2.5.1.	El intervalo G_2 como fase preparatoria de la división celular	118
2.5.2.	Condensación y relajación de la cromatina	122
2.5.3.	El aparato mitótico y los movimientos cromosómicos	128
2.5.4.	La citocinesis o división citoplasmática	142

2.6.	<u>La reproducción celular durante el desarrollo. Caso del hígado de los vertebrados</u>	147
2.6.1.	Cinética de crecimiento	147
2.6.2.	Cinética proliferativa y diferenciación celular	160
2.6.3.	Regulación de la proliferación celular y el crecimiento de los órganos	172
3.	<u>Material y métodos</u>	193
3.1.	<u>Material</u>	194
3.2.	<u>Estudios de crecimiento</u>	195
3.2.1.	Determinación de la cantidad de DNA/órgano	195
3.3.	<u>Estudios citocinéticos</u>	199
3.3.1.	Medida del índice mitótico en el parénquima hepático, preparación del material para microscopía óptica	199
3.3.2.	Acumulación mitótica con bloqueantes	201
3.3.3.	Incorporación de timidina tritiada al DNA	209
3.3.4.	Coincidencia mitótica	211
3.4.	<u>Estudios estructurales</u>	220
3.4.1.	Preparación del material para microscopía electrónica	220
3.4.2.	Morfometría	
4.	<u>Resultados</u>	226
4.1.	Contenido de DNA en hígado, corazón y encéfalo en embriones de 8 a 10 días : Curvas de crecimiento absoluto y relativo entre órganos	227

4.2.	Determinación de la constante de proliferación (PK), de la duración media del ciclo celular (GT) y de la duración de la mitosis (MT) de los hepatocitos de embriones de 10 y 14 días, por el método de la acumulación mitótica	236
4.3.	Constante de proliferación (PK) y duración media del ciclo celular (GT) de los hepatocitos en embriones de 5 a 20 días de desarrollo	239
4.4.	Síntesis de DNA en el hígado de embriones de 10 y 14 d	243
4.5.	Coincidencia mitótica en el parénquima hepático de embriones de 10 y 14 días	244
4.6.	Estructura general del hígado embrionario : Fracción del órgano ocupada por el parénquima a lo largo del desarrollo	250
4.7.	Microscopía electrónica del hepatocito embrionario	257
5.	<u>Discusión</u>	317
5.1	Generalidades	318
5.2	Proliferación celular y modelos de crecimiento	321
5.3	Sincronía de células hermanas, crecimiento celular y modelos del ciclo celular	331
5.4	Ultraestructura celular y actividad proliferativa	343
6.	<u>Conclusiones</u>	351
7.	<u>Bibliografía</u>	362

1. Introducción

"La observación científica es una actividad cargada de teoría"

N. R. Hanson 1958

"Todo fluye" Heráclito VI AC - V AC

"Omnis cellula e cellula" R. Virchow 1855

Al iniciar la redacción de un trabajo científico parece apropiado el introducir un sumario de los fundamentos teóricos del mismo y de los propósitos que han motivado su desarrollo. Aunque ambas cosas sean tratadas con mayor extensión en los capítulos de revisión y de material y métodos, el presentarlos al principio en forma breve y relacionada permite ver mejor la perspectiva lógica del trabajo.

1.1. Sobre la reproducción celular

Asimilación, recambio y crecimiento son tres propiedades tan inherentemente ligadas a lo biológico que la famosa expresión atribuida a Heráclito parece hecha a propósito para la "materia viva". Si bien en los niveles de organización macroscópicos (organismos y poblaciones) estas propiedades son conceptos antiguos, su fundamento microscópico (celular y molecular) no empezó a conocerse hasta la segunda mitad del siglo pasado con los descubrimientos morfológicos que condujeron a un primer aclaramiento del problema de la reproducción celular. El honor de haber iniciado esta importante senda de la Biología correspondió principalmente a Remak, Virchow, Schneider, Bütschli, Strasburger, von Beneden, Fleming, Boveri y Waldeyer (Grundmann 1967, Taylor 1964, Terrada y López Piñero 1974)

Durante la primera mitad de la presente centuria el desarrollo conjunto de Morfología y Fisiología celulares, y, muy especialmente, la introducción de los trazadores radiactivos en la investigación biológica y mé-

dica en los años 40 (Cameron y Thrasher 1971) ha conducido a una representación mucho más analítica de recambio y crecimiento, que en los organismos pluricelulares ocurren a dos niveles: El recambio de los componentes moleculares de las células por síntesis, degradación e intercambio y el recambio celular de los tejidos y órganos por reproducción y eliminación celulares. En ambos niveles puede producirse crecimiento siempre que el balance del recambio sea positivo, esto es, que predomine la síntesis sobre la degradación o la reproducción sobre la eliminación.

La síntesis, no compensada por la degradación, de las formas moleculares características de una determinada célula produce un crecimiento que conduce finalmente a la división celular, en la que de forma más o menos equitativa los componentes de la célula progenitora se reparten entre dos células hijas. El análisis de la relación entre los procesos de síntesis y crecimiento y la reproducción celular empezó con la simple distinción de dos etapas en la vida celular, la mitosis o fase de división y la interfase o fase de crecimiento.

Los primeros estudios sobre la reproducción celular se centraron en la mitosis debido a la riqueza morfológica de la misma. La interfase, llamada fase de reposo por los citólogos clásicos, no es llamativa para el microscopista y permaneció olvidada por mucho tiempo (Baserga 1976). El análisis de los acontecimientos metabólicos interfásicos tiene un origen bastante preciso, se trata del trabajo de Howard y Pelc en 1951, en el que mediante la utilización de Fósforo-32 como trazador de la síntesis de DNA en raíces de Vicia faba, demostraron que el DNA cromosómico es sintetizado en un intervalo discreto de la interfase. La posterior introducción de la Timidina-³H y el desarrollo de la técnica autorradiográfica (Baserga y Malamud 1969) condujo a la imagen clásica del ciclo celular constituida por el encadenamiento cerrado de cuatro etapas: Primer intervalo interfásico (G1), Síntesis del DNA cromosómico (S), Segundo intervalo interfásico (G2) y Mitosis (M), subdividida esta última en las conocidas fases (Pro, Meta, Ana y Telofase) descritas ya en el siglo pasado por Strasburger. Esta representación de la interfase da cuenta únicamente de la duplicación del DNA cromosómico; pero el estudio de la síntesis de otros

componentes, especialmente enzimas, ha permitido describir el patrón de síntesis de cada componente en el ciclo celular, que en muchos casos ocurre en un intervalo discreto no necesariamente coincidente con el de la síntesis del DNA cromosómico (Mitchison 1971). De este modo, la interfase aparece como un programa biosintético múltiple, definido para cada tipo de célula y condiciones ambientales, que conduce a la duplicación de todos los componentes celulares según un patrón cronológico determinado.

La cinética y la estructura del ciclo celular son actualmente un campo de investigación muy activo del que las referencias de esta tesis son tan sólo una pequeña muestra. Entre todas las publicaciones que citamos queremos destacar por su importancia tres monografías sobre Ciclo Celular (Mitchison 1971, Prescott 1976 y Baserga 1976) en las que aparece ya un cuerpo de doctrina común, sedimento de innumerables trabajos y núcleo de una teoría del ciclo celular. Puede decirse que la investigación en este campo ha pasado ya la etapa inicial completamente empírica con algún balbuceo teórico y se encuentra actualmente en pleno desarrollo de una teoría coherente que permite interpretar resultados experimentales y proponer nuevos experimentos dirigidos a comprobar o refutar hipótesis. Otro hecho indicativo de la relativa madurez de los estudios sobre el ciclo celular es que en 1974 el prestigioso Cold Spring Harbor Laboratory patrocinó, a instancias de J. Watson, un congreso sobre control de la proliferación de células animales, cuya organización fue encomendada a B. Clarkson y R. Baserga (Clarkson y Baserga (Ed) 1974). La importancia de este campo de investigación radica no sólo en su posición nuclear dentro de la Biología, sino además, en las considerables repercusiones que tiene en la patología neoplásica. Esquematizando las tendencias de investigación sobre ciclo celular en la actualidad, podemos señalar como más importantes las siguientes :

A) La estructura metabólica del ciclo de reproducción celular y los factores intracelulares mayormente relacionados con el control de la progresión del ciclo son objeto de muchos trabajos.

Un problema fundamental es el de la configuración cinética del ciclo : Según la concepción clásica un encadenamiento ininterrumpido de acontecimientos metabólicos conduce a una célula desde el final de la mitosis que la ha originado a la siguiente división. Sin embargo, algunos hechos experimentales, como la gran variabilidad de tiempos intermitóticos en una población celular y la existencia de poblaciones "fuera del ciclo", esto es, en fase G₀ o de reposo (Lajtha 1963) que pueden ser reconducidas sincrónicamente al mismo con estímulos apropiados, no concuerdan con el esquema clásico. Una nueva concepción cinética del ciclo celular (Burns y Tannock 1970 y Smith y Martin 1973), denominada modelo de probabilidad de transición, admite la progresión del ciclo se halla interrumpida en algún punto dentro del G₁ en todos los tipos de célula aun las de proliferación rápida, en este punto el programa metabólico del ciclo queda desconectado y la célula puede permanecer cualquier tiempo en este estado del que sale al azar, pero con una probabilidad definida de realizar la transición que la reconducirá al programa de reproducción. Destacamos la importancia de este nuevo modelo del ciclo celular en la introducción de esta tesis ya que uno de los objetos de la misma ha consistido en el desarrollo y puesta a prueba en nuestro material de un método original encaminado a su verificación.

B) Otro aspecto importante es el control extracelular del ciclo de reproducción que en los unicelulares es fundamentalmente de tipo trófico , mientras que en los pluricelulares se caracteriza por su alto grado de especificidad. En estos últimos, el control es propiamente intercelular, en el sentido de una regulación por productos difusibles (hormonas) segregados por tipos celulares definidos y capaces de fijarse en las células con capacidad receptora produciendo modificaciones en su metabolismo. La especificidad radica en que sólo algunos tipos celulares tienen el receptor apropiado para la hormona. La mayor parte de hormonas conocidas pueden tener efectos más o menos importantes sobre la progresión del ciclo celular junto a los otros efectos metabólicos que determina la hormona sobre la célula receptora. Existen, sin embargo, algunas hormonas cuyo efecto

fundamental por el que son conocidas consiste en su acción sobre la proliferación celular. Dentro de éste último grupo destacan los denominados : "Chalones" (Bullough y Rytömaa 1965); se trata de proteínas segregadas específicamente por un tipo celular determinado y con acción inhibitoria sobre el ciclo reproductor de la misma clase de célula que los produce. La importancia de los chalones reside en que permiten que una célula "conozca" la cantidad de células de su mismo tipo en la población a través de la concentración en el medio del chalon específico correspondiente. Los chalones constituyen el sustrato molecular de las señales en los sistemas de control de la proliferación celular por retroalimentación negativa, que explican con facilidad la cinética de las reacciones regenerativas y del crecimiento embrionario de los órganos. Aunque la detección y aislamiento de estos factores se ve complicada por las dificultades de su ensayo biológico, la bibliografía sobre el tema está plagada de artefactos, es indudable la existencia de chalones específicos para varios tipos celulares en los mamíferos : Una extensa monografía publicada recientemente da cuenta del estado actual de este campo (Houck (Ed) 1976).

La existencia de reguladores específicos en los pluricelulares no significa que los factores que no lo son carezcan de importancia. En realidad, las concentraciones plasmáticas de iones, aminoácidos, azúcares y otras pequeñas moléculas cuya influencia sobre el metabolismo es más general, y por tanto, menos específica o restringida que la de las hormonas, pudieran comportarse como reguladores específicos de tipo celular, no en sí mismos tomados individualmente, sino en el sentido de componentes de señales polimoleculares cuya especificidad radicaría en una combinación característica de factores.

C) Por último consideraremos la implicación de la reproducción celular en el desarrollo de los organismos, en su mantenimiento y en sus turnos. Aquí se plantea el estudio de los mecanismos de producción y mantenimiento en proporciones definidas de los diversos tipos celulares que componen un organismo pluricelular. Un aspecto fundamental es el de la relación entre ciclo y diferenciación celulares, que puede verse desde

dos lados, por uno la reproducción celular como origen de la diferenciación celular y por otro las condiciones de reproducción asociadas a un determinado fenotipo celular.

El primer aspecto se refiere a que los mecanismos que diferencian las células operan en muchos casos durante la reproducción de las mismas existiendo aquí dos conceptos interesantes : Las divisiones celulares asimétricas y los ciclos cuánticos. Estos últimos son ciclos de reproducción celular en el transcurso de los cuales, probablemente en algún punto específico del programa de reproducción, se realiza un cambio permanente en el patrón celular de genes activos y, por tanto, en el espectro de proteínas sintetizadas por la célula (Dientsmann y Holtzer 1975).

El segundo lado indicado atiende a las diferencias en la capacidad de reproducción entre los diversos tipos celulares de un organismo; compárese, por ejemplo, la elevada capacidad reproductiva de las células basales de la epidermis o de las de las criptas de la mucosa intestinal con la incapacidad de las neuronas para la reproducción. ¿ A cuáles de entre las diferencias de composición y estructura de estas células se les puede atribuir mayor importancia en relación a las marcadas diferencias en capacidad reproductiva ?. Una forma de abordar experimentalmente esta cuestión es investigar las relaciones entre las modificaciones en el fenotipo molecular o estructural de un tipo celular y los cambios de su cinética proliferativa en el curso del desarrollo embrionario o de reacciones regenerativas o de transformaciones neoplásicas que afecten a este tipo celular.

En relación a los trastornos del estado diferenciado, los estudios cinéticos sobre la reproducción celular no tienen un interés meramente científico en la patogenia neoplásica, sino que desde los años 60 es apreciada su utilidad en la programación de la terapéutica antineoplásica (Perry 1977). Así, las técnicas para el estudio de la cinética de reproducción celular son un elemento imprescindible en la investigación sobre terapéutica del cáncer y empiezan a ser, y lo serán indudablemente de forma más generalizada en un futuro próximo, el fundamento racional al que

deberá acudir el oncólogo para programar y seguir "de cerca" los tratamientos de sus pacientes. Aunque para esto último hace falta adecuar las técnicas de ciclo celular a la utilización clínica. En la actualidad esta clase de trabajos están bastante avanzados en las leucemias, mientras que en los tumores sólidos hay más dificultades (Perry 1977).

1.2. Sobre reproducción y diferenciación hepatocelulares

Aunque creemos importante el estudio del estroma, del sistema sinusoidal y de los conductos biliares para la comprensión del desarrollo hepático, habiéndose limitado nuestro trabajo al parénquima del órgano, en general, no serán tratados ni en esta introducción ni en los capítulos de revisión los aspectos que hacen referencia a los otros componentes.

El parénquima hepático se compone de una sola clase de células bien diferenciada, el hepatocito. Se trata de una célula especializada en funciones tales como la síntesis, almacenamiento y degradación del glucógeno, la síntesis y secreción de algunos péptidos y proteínas plasmáticas como la albúmina, el fibrinógeno, la protrombina, las somatomedinas etc., la elaboración y secreción de la bilis, las reacciones de inactivación y detoxificación de drogas, la ureogénesis y otras reacciones mitocondriales que sin ser específicas del hepatocito le caracterizan cuantitativamente dada la abundancia de mitocondrias en el citoplasma hepatocelular etc. Funciones metabólicas fundamentales y actividades secretoras endocrinas y exocrinas definen al tipo celular mejor conocido entre las células animales. A pesar de la abrumadora cantidad de datos de que se dispone sobre el hepatocito, téngase en cuenta que la mayor parte de estudios bioquímicos en los animales se han hecho en esta célula, muy poco se conoce en relación a los mecanismos de control de su reproducción.

El recambio molecular de parénquima hepático del animal adulto es extremadamente activo, el 60 % aproximadamente de las proteínas intracelulares del hepatocito de rata se renueva cada 24 h (Haschemeyer 1976), en cambio, el recambio celular se caracteriza por su lentitud no alcanzando apenas valores de 1/10.000 el índice mitótico del parénquima hepático en los animales adultos (Verly 1976). Realmente, los hepatocitos de un or-

ganismo adulto pueden ser considerados como una población celular en estado Go o fuera de ciclo, en su mayoría. Sin embargo, esta pérdida de la capacidad reproductiva que se produce concomitantemente con el desarrollo del fenotipo diferenciado de la célula no es irreversible como en el caso de las neuronas, sino que mediante estímulos apropiados como la hepatectomía parcial o la inducción de lesiones hepatocelulares por tóxicos se desencadenan reacciones regenerativas que implican la reactivación reproductiva de una fracción más o menos grande de la población.

El parénquima hepático se desarrolla en el embrión de los vertebrados a partir de un brote endodérmico en la región del duodeno, junto al mesodermo de ductus venosus que origina el estroma y los sinusoides del órgano. Los conductos biliares tienen el mismo origen que el parénquima, diferenciándose progresivamente del mismo. Los hepatocitos se adhieren unos a otros formando trabéculas que en las aves se anastomosan dando una estructura reticular y en los mamíferos se ordenan en estructuras radiales llamadas lobulillos hepáticos.

La diferenciación celular del parénquima hepático no se realiza de una vez sino en múltiples etapas antes y después del nacimiento, conllevando modificaciones estructurales y moleculares, así como cambios en la cinética de reproducción celular. Desde el punto de vista molecular, la diferenciación del hepatocito se caracteriza por la aparición de las actividades enzimáticas propias de la célula adulta de forma progresiva durante el desarrollo. Las actividades enzimáticas aparecen en grupos coincidiendo con el establecimiento de los diversos sistemas hormonales del organismo o con los cambios nutricionales que comporta el paso de la vida embrionaria a la del animal recién nacido (Tsanev 1975). Asimismo, la síntesis y secreción de albúmina se intensifica durante el desarrollo, mientras que la de alfa-fetoproteína (propia del hígado embrionario) va disminuyendo.

Dado que la progresión de la diferenciación hepatocelular se acompaña de una reducción muy considerable de su actividad reproductiva y que en los casos en que esta última se recupera (regeneración o transforma-

ción neoplásica) se producen modificaciones en la estructura y en la composición molecular de la célula que semejan reversiones parciales a etapas anteriores del desarrollo, es muy sugestiva la idea apuntada por Tsanev de que existen relaciones de exclusión entre la expresión del fenotipo diferenciado de una célula y la actividad reproductiva de la misma; ello implicaría relaciones inhibitorias recíprocas entre los genes codificantes de proteínas específicas de tipo celular y los genes implicados en el programa del ciclo de reproducción (Tsanev 1975).

En relación al control extracelular o plasmático de la reproducción hepatocelular existe una gran abundancia de datos sueltos pero sin que, por el momento, sea posible concebir un esquema del control global. Con todo, puede admitirse que la regulación del ciclo celular en el parénquima hepático es seguramente bastante más compleja que la de otros tipos celulares, en concordancia con la diversidad de relaciones metabólicas que el hepatocito sostiene con las demás células del organismo. En este control están implicadas varias hormonas "clásicas" y aminoácidos que se comportan como estimulantes de la reproducción hepatocelular *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, hay evidencias de fracciones proteicas del plasma sanguíneo con probada actividad inhibitoria de la síntesis de DNA o de la división celular de forma específica para el hepatocito (Verly 1976) que podrían corresponder al concepto de "chalone" hepatocelulares, si pudiera demostrarse que además de actuar específicamente sobre el hepatocito son también producidos por dicha célula.

1.3. Fundamentos y objetivos de la tesis

"Magnum esse solem philosophus probabit, quantus sit mathematicus" Seneca (4AC - 65DC)

Quisiéramos esbozar en este apartado el trasfondo teórico de nuestro proyecto doctoral, los propósitos que lo animaron y el plan concreto que nos propusimos.

Durante nuestros años de estudiante de Medicina tuvimos la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Histología y Anatomía Patológica donde nos familiarizamos con los principales métodos y objetivos de la morfología. Desde entonces dos problemas centraron nuestra atención, el de la reproducción celular, cosa nada excepcional si se tiene en cuenta

que una de las principales tareas del laboratorio era el diagnóstico histológico de tumores, y el de, permítasenos llamarle así, "matemática de la morfología" : La mayor diferencia, en lo formal, entre las ciencias físicas y la mayor parte de las biológicas radica en el grado de desarrollo matemático de los conceptos que manejan y, por ende, en su profundidad y exactitud. Esto es especialmente válido para la morfología, cualitativa e inexacta. Nos preguntábamos si podría intentarse una explicación racional de las estructuras a través de una mecánica del desarrollo. Parecía que la única vía de acceso racional a las estructuras biológicas pasaba a través de su descripción molecular y una vez tendido el puente al campo de la química, las propiedades de la estructura podrían deducirse a partir de las propiedades moleculares. ¿ Significaba esto que no valía la pena intentar ningún análisis cuantitativo de los desarrollos hasta que su descripción en términos moleculares fuera completa ? . No fue esta nuestra opinión, creímos que de algunos aspectos se conocía lo suficiente para poderlos estudiar cuantitativamente y que una mecánica del desarrollo era factible hasta cierto punto.

Los desarrollos embrionarios pueden descomponerse analíticamente en fenómenos tales como crecimiento, diferenciación y movimientos morfogenéticos. Por su misma naturaleza, el primero de ellos es más fácil de medir y, por tanto, su estudio era algo que convenía a nuestra posición en relación a la morfología. A través de la Embriología de Balinsky (Balinsky 1965) conocimos los trabajos clásicos sobre crecimiento (Minot, Robertson, Schmalhausen, Huxley, Needham, von Bertalanffy) algunos de los cuales leímos después directamente. Estos trabajos relativamente antiguos, datan de finales del siglo pasado hasta los años 40 del actual, habían planteado ya los problemas fundamentales en relación a la regulación de los crecimientos embrionarios, aunque de forma rudimentaria de acuerdo con los escasos conocimientos de la época sobre la reproducción celular, reducidos, como antes hemos comentado, a la morfología de la mitosis. Los rápidos progresos realizados a partir de los años 50 en el campo de la reproducción celular o del ciclo celular, como se le llamaría ahora más co -

rientemente, deberían permitir un enfoque más analítico y operativo de los problemas que plantean los crecimientos embrionarios. De esta manera se originó nuestro proyecto doctoral : Analizaríamos el crecimiento de un órgano embrionario utilizando "todo lo que pudiéramos" de la nueva metodología y de las nuevas concepciones sobre reproducción celular y cinética de poblaciones.

Elegimos el parénquima hepático por las interesantes posibilidades experimentales que ofrecía para una línea de investigación coherente sobre ciclo celular. Se trataba, en efecto, de una de las células metabólicamente mejor conocidas, entre las de los pluricelulares; su interés en relación a la reproducción celular es algo a primera vista paradójico, el hepatocito del animal adulto raramente se reproduce. Sin embargo, esta célula procede del hepatocito del embrión que sí se reproduce y, además, puede reincorporarse al programa de reproducción en diversas circunstancias tales como las reacciones regenerativas posthepatectomía parcial o por lesiones hepáticas tóxicas y en las transformaciones neoplásicas que conducen a los hepatomas. Era evidente que el estudio de las relaciones entre estos diferentes estados de la célula hepática debería dar información sobre la regulación del ciclo celular.

Empezaríamos nuestra línea de investigación con un estudio de la reproducción celular en el parénquima hepático de embrión de pollo, que constituiría nuestra tesis doctoral y proseguiríamos después del doctorado con otras situaciones experimentales como la regeneración hepática, la inducción de hepatomas y los cultivos hepatocelulares.

Planeamos nuestro trabajo doctoral en tres partes :

Primera parte : Un estudio del crecimiento global del hígado, al modo clásico, pero utilizando la cantidad de DNA/órgano en lugar del peso/órgano como parámetro de crecimiento, ya que a diferencia de este último, mantiene una relación constante con el número de células (siempre que no existan ciclos endomitóticos) y, en todo caso, es una magnitud más directamente relacionada con la reproducción celular. Esta primera parte incluiría también un estudio comparativo entre el crecimiento del hígado y otros dos

órganos (corazón y encéfalo) medidos también como $DNA/\text{órgano}$; el objetivo de este estudio era conocer si estos tres órganos mantenían o no, durante su crecimiento embrionario, una relación alométrica de Huxley, que implica una variación equiproporcional de las velocidades específicas de crecimiento.

Segunda parte: La información que puede obtenerse de un estudio como el anterior se refiere al resultado de la reproducción de los distintos tipos celulares que componen el hígado y aunque la célula del parénquima es la más abundante y el crecimiento global del órgano pudiera reflejar bien el del parénquima, esto sería sólo una buena aproximación en el mejor de los casos.

En esta segunda parte, realizaríamos un estudio directo de la reproducción del hepatocito mediante la técnica del bloqueo y acumulación de mitosis con Colchicina o Vinblastina. Mediante estos experimentos podríamos conocer el tiempo de generación promedio (GT), esto es, la duración media del ciclo celular de los hepatocitos a distintos tiempos del desarrollo embrionario. Otro objetivo de esta parte sería estudiar la estructura cinética interna del ciclo de reproducción, mediante la medición de un nuevo parámetro ideado por nosotros y que denominamos "Coincidencia Mitótica" (Mco). Este parámetro puede ser calculado a partir de variables determinables independientemente unas de otras, pudiendo realizarse el cálculo de acuerdo con el modelo clásico del ciclo celular o de acuerdo con el nuevo modelo de probabilidad de transición (Burns y Tannock 1970 y Smith y Martin 1973). Ya que la coincidencia mitótica podía medirse directamente en las preparaciones, el valor obtenido podía ser comparado con los calculados y decidir cuál de los dos modelos utilizados para el cálculo se ajustaba más a la realidad. Este estudio debía ser especialmente interesante ya que hasta ahora no existía un método utilizable in vivo para discriminar entre los dos modelos.

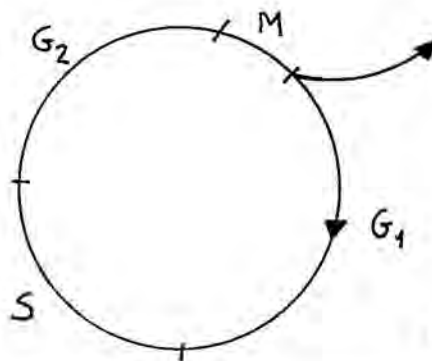
Tercera parte: Por último haríamos un estudio estructural del hepatocito embrionario mediante microscopía electrónica, aplicando métodos estereológicos que nos permitirían una cuantificación parcial de la estructura. Los datos obtenidos podrían ser comparados con los datos cinéticos y podría intentarse el establecimiento de correlaciones entre estructura y reproducción celulares.

2. Reproducción Celular

2.1 El Ciclo celular : Métodos de estudio

2.1.1 Objetivos del análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular puede abordarse a dos niveles. En primer lugar es necesario realizar el análisis cinético, esto es, la determinación de su duración o período, que corrientemente se designa por GT (Generation Time) y la de sus intervalos fundamentales G₁T, ST, G₂T y MT (Figura 1). Es de la mayor importancia el estudio de la estadística de la variabilidad de estos parámetros, ya que ello permite realizar inferencias relativas a la mecánica del ciclo, enlazando con el análisis secuencial.



$$GT = G_1T + ST + G_2T + MT$$

Figura 1 El período o duración del ciclo celular GT (Generation Time) es la suma de las duraciones de los cuatro intervalos fundamentales : G₁T (duración del intervalo G₁), ST (duración del intervalo de síntesis del DNA cromosómico), G₂T (duración del intervalo G₂), MT (duración de la mitosis).

Una vez realizada la caracterización cinética, puede intentarse averiguar como se encadenan los acontecimientos del programa de reproducción celular, es decir, el análisis secuencial. Durante el crecimiento celular interfásico los diversos componentes celulares duplican su cantidad, bien sea a través de una síntesis continua o bien, como sucede en muchos casos (Mitchison 1971), mediante un período de síntesis restringido que ocupa una fracción definida del tiempo interfásico. El análisis

secuencial del ciclo celular trata de determinar la posición de los intervalos de síntesis de los diferentes componentes celulares, así como la de las modificaciones periódicas de su estructura molecular, cuya repercusión en el estado físico de la estructura celular de que forman parte puede constituir un paso decisivo del programa de reproducción. Así, por ejemplo, las histonas, cuya síntesis se realiza en un intervalo coincidente con la síntesis del DNA cromosómico, sufren modificaciones periódicas tales como acetilaciones y fosforilaciones que podrían explicar las modificaciones estructurales de la cromatina durante el ciclo de reproducción. En Physarum ha podido demostrarse que el grado de fosforilación de la histona H1 alcanza un máximo poco tiempo antes de la profase volviendo a disminuir seguidamente, este hecho ha conducido a la hipótesis de que la fosforilación de la H1 es responsable de los pasos iniciales del proceso de condensación de la cromatina en la profase de la mitosis (Bradbury 1975). De probarse esta hipótesis se habría dado un paso importante en la interpretación molecular de los llamativos cambios morfológicos de la cariocinesis; en este campo, como en otros, el reduccionismo molecular es un objetivo primordial, ya que únicamente a este nivel las relaciones de determinación entre los acontecimientos del programa se hacen inteligibles.

En punto al análisis de las relaciones de determinación entre los pasos del ciclo celular, es necesario advertir sobre un prejuicio de simplificación en el que es fácil incurrir: El hecho de que exista, indudablemente, un programa de reproducción invariante (en condiciones naturales) constituido por una secuencia definida de intervalos de síntesis y otros cambios, no es razón suficiente para pensar que todos los acontecimientos del programa estén ligados estrechamente en una única secuencia de determinación. En efecto, hay técnicas experimentales (ver 2.1.4.4) que permiten dissociar acontecimientos del ciclo, con lo cual la secuencia invariante según naturaleza muestra que no es invariable, ya que puede ser modificada introduciendo modificaciones experimentales. Así, en la levadura Schizosaccharomyces pombe el tratamiento con hidro-

xiurea (un inhibidor de la síntesis de DNA) hacia el final del ciclo retrasa considerablemente la síntesis de DNA y la división celular correspondientes al ciclo siguiente, sin embargo, la duplicación de tres actividades enzimáticas estudiadas (aspartatotranscarbamilasa, ornitinatranscarbamilasa y alcoholdehidrogenasa) no se retrasan sino que ocurren al tiempo debido como en los cultivos control no tratados con el inhibidor (Mitchison 1974), resultados semejantes han sido obtenidos en Bacillus subtilis (Masters y Donachie 1966) y en células de mamífero (Churchill y Studzinski 1970, Gelbard 1969, Klevecz 1969). Todo ello induce a suponer que el programa de reproducción se halla constituido por varias secuencias más o menos largas que circulan en paralelo y que mantienen relaciones de determinación en algunos puntos, pero funcionando independientemente entre los mismos: Esto explicaría la posibilidad de introducir experimentalmente dislocaciones entre las secuencias como en el ejemplo anterior. Sugerimos que este concepto podría representarse gráficamente de una forma analógica (Figura 2) mediante un sistema de dos anillos concéntricos girando a la misma velocidad angular y unidos por lazos flojos en algunos puntos, representando cada anillo una secuencia. La detención del movimiento de uno de los anillos no afectará por algún tiempo al otro, permitiendo un desplazamiento o desfase entre ambos. El movimiento del segundo anillo no cesará hasta que uno de los lazos se tense, es decir, hasta que la segunda secuencia llegue a un punto en el que exista una relación de dependencia con la secuencia detenida en primer lugar.

Esta posibilidad de dislocación de secuencias del ciclo debe ser tenida en cuenta en relación a los posibles artefactos que aparecerán en el análisis secuencial realizado con poblaciones celulares sincronizadas mediante agentes bloqueantes (ver sincronización inductiva 2.1.4.2).

Los estudios sobre ciclo celular adquieren objetivos adicionales cuando se trata de células propias de organismos pluricelulares. En este caso importan mucho las interacciones reguladoras de hormonas, chalone y factores de crecimiento con el programa de reproducción celular. En un primer intento hay que ensayar los efectos de estos agentes sobre la cinéti-

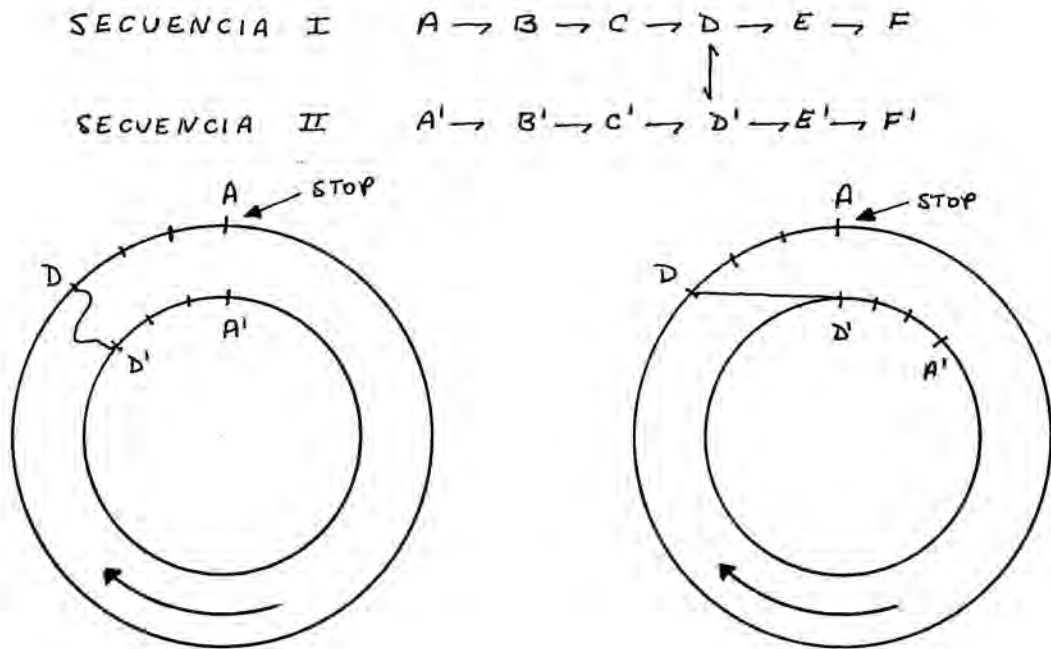


Figura 2 La detención de la secuencia I (anillo exterior) en A determinará la detención de la secuencia II (anillo interior) en D' ya que en este punto hay una relación de dependencia entre ambas secuencias. El hecho de que la secuencia II siga su curso por algún tiempo después de la detención de la secuencia I determinará un desplazamiento o desfase entre las mismas.

ca del ciclo y en segunda aproximación puede abordarse el análisis de la interacción entre el factor regulador y la secuencia del programa de reproducción. Dado que la mayor parte de los ensayos de regulación se realizan en cultivos celulares es importante hacer notar que el resultado de los mismos no da cuenta directamente del verdadero papel fisiológico que el factor ensayado desempeña en el organismo pluricelular; esto últi-

mo constituye un objetivo fundamental, que de no ser alcanzado deja el estudio de la regulación del ciclo celular a nivel de artefactos in vitro de escasa significación biológica. La realización de ensayos in vivo, con todas las dificultades que conlleva, es, por tanto, inexcusable.

2.1.2 La población celular

Aunque ocasionalmente puedan hacerse estudios sobre reproducción celular basados en la observación de una misma célula aislada durante todo su ciclo, por diversas razones, tanto de orden práctico como teórico, la mayor parte de trabajos sobre reproducción celular tienen su fundamento en experimentos con poblaciones, utilizando tanto mediciones globales de la población como distribuciones de frecuencias de mediciones realizadas separadamente en sus células componentes. Es obvio, por tanto, que el estudio de la metodología para el análisis del ciclo celular debe empezar por el de los elementos de la teoría de poblaciones celulares.

Existe una gran diferencia entre los conceptos de población celular in vitro y de población celular in vivo, mientras que el primero se mueve estrictamente en el campo de la observación, en el sentido de que puede definirse directamente por características observables de un cultivo celular, el segundo resulta de una idealización a partir de lo observable. Un cultivo celular suele componerse de un sólo tipo de célula, sin que ello sea incompatible con un cierto grado de heterogeneidad, que se reproduce en un medio de composición definida y libre de la influencia de otras clases de células : En este caso podemos hablar propiamente de una población celular pura y aislada. Difícilmente podríamos encontrar esta entidad en un organismo pluricelular; aquí hemos de referirnos a entidades más complejas como los tejidos y los órganos, agrupaciones celulares compuestas de poblaciones celulares íntimamente relacionadas. Con todo, es posible referirnos a poblaciones celulares in vivo definiéndolas por un tipo celular componente y abstrayéndolas de la entidad histológica de que formen parte. Debido a las interacciones reguladoras, la cinética de población dentro de un organismo pluricelular es mucho más compleja que en el caso de los cultivos. Especialmente importante es la

diferenciación celular, que introduce heterogeneidad en las poblaciones, y también, la importación de células de otras poblaciones o su eliminación fisiológica, que impiden tratar a muchas poblaciones in vivo como cerradas, complicando con ello su análisis cinético.

En 1960 Messier y Leblond propusieron una clasificación de las poblaciones celulares de ratón y de rata, que puede hacerse extensiva a todos los organismos pluricelulares. De acuerdo con esta clasificación, las poblaciones pueden ser expansivas, estáticas y de recambio. Más recientemente se ha visto la necesidad de introducir una nueva clase de población, la población intermedia (Leblond 1972).

a) Poblaciones expansivas : Son poblaciones cerradas (sin importación ni exportación de células), en las que todas sus células se reproducen a la misma velocidad, es decir, son cinéticamente homogéneas. La medida del crecimiento de la población permite conocer el valor del período del ciclo celular (GT) ya que coincide con el del período de duplicación de la población. Las poblaciones celulares de los órganos embrionarios son el ejemplo más característico, pudiendo derivar, en el curso del desarrollo, hacia poblaciones estáticas o hacia poblaciones de recambio, pasando por formas intermedias.

b) Poblaciones estáticas : Se trata de poblaciones cuyas células no se reproducen. En los metazoos este tipo de población está representado por las neuronas de los vertebrados en la vida postembrionaria, que incrementan su volumen durante el crecimiento del organismo pero sin llegar a reproducirse.

c) Poblaciones de recambio : Son de gran interés ya que constituyen la mayoría de poblaciones celulares en los animales. Son poblaciones abiertas e inhomogéneas cinéticamente : La reproducción celular está ligada a un proceso de diferenciación celular característico de cada población, cuyo producto final son células terminales completamente diferenciadas, incapaces de reproducirse y destinadas a ser eliminadas de la población. En el origen del sistema están las células madre o "stem cells" que se reproducen regenerando la matriz del sistema y produciendo células para la diferenciación. Entre las células madre y las terminales hay

células correspondientes a distintos grados de diferenciación, que pueden o no reproducirse según los casos. La regulación del sistema determina que exista un balance neutro entre la reproducción y la eliminación celulares con lo que el tamaño de la población se mantiene constante. Es evidente, por tanto, que en este caso no puede utilizarse la medida del crecimiento de la población para calcular el período del ciclo celular. En poblaciones de recambio en que todas las células que se reproduzcan lo hagan a la misma velocidad, el período del ciclo celular equivale al tiempo de recambio, es decir, al tiempo necesario para que todas las células de la población sean reemplazadas por células nuevas.

La epidermis, el epitelio de la mucosa intestinal y la médula ósea hematopoyética son ejemplos típicos de esta clase de poblaciones. Durante el crecimiento del organismo y también en el curso de reacciones regenerativas estas poblaciones son a la vez expansivas y de recambio.

d) Poblaciones intermedias: Según Leblond 1972, las poblaciones celulares intermedias son poblaciones con reproducción y sin eliminación celulares, como las expansivas, pero inhomogéneas cinéticamente, es decir, con una matriz celular que se reproduce (células madre) originando al resto de la población formado por células diferenciadas que no lo hacen. Es el caso del músculo esquelético donde las células satélite son las células madre y de la neuroglia donde la función progenitora corresponde a las células subependimarias. Esta clase de población no es más que una forma de transición del tipo expansivo al tipo estático, con pérdida de la homogeneidad cinética, del que existen otros ejemplos durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, en los dos casos citados se trata de situaciones definitivas propias de la etapa postnatal del desarrollo. Dentro del grupo de las poblaciones intermedias, nosotros incluiríamos otra forma de transición, la población expansiva-de recambio que ya ha sido comentada más arriba.

Tanto en las poblaciones de recambio como en las intermedias es necesario introducir el concepto de fracción de crecimiento o de proliferación (Mendelsohn 1963) definido como la proporción de células que se reproducen respecto del total de la población. En poblaciones inhomogéneas ci -



néticamente, la medición de la fracción de crecimiento es una condición previa indispensable para la utilización correcta de métodos de análisis cinético basados en las frecuencias de fase. El método más común para realizar esta medición consiste en el marcado continuo o repetido con Timidina tritiada : Este precursor radiactivo se incorpora al DNA cromosómico durante el intervalo S del ciclo, pudiendo ser detectadas las células que lo han incorporado mediante la Autorradiografía. Mediante una administración continua o con repetidas administraciones de Timidina tritiada es posible marcar todas las células con capacidad reproductiva, quedando las demás sin marcar ; la relación entre el número de células marcadas y el total mide la fracción de crecimiento de la población. Como puede comprenderse fácilmente este parámetro es de una gran importancia cinética. Así, por ejemplo, la alteración fundamental de la cinética del crecimiento tumoral no consiste, generalmente, en que el período del ciclo reproductor de las células tumorales sea más corto que el de las correspondientes normales, sino, más bien, en el valor de la fracción de crecimiento que es mayor en el tumor que en la población normal de la que deriva (Baserga 1965).

Otro aspecto de la cinética de la población celular es el grado de sincronización de los ciclos de reproducción de sus células. Una forma sencilla de estudiar este problema consiste en medir el índice mitótico (MI) de la población a diferentes tiempos (Figura 3). El MI es la proporción de células en mitosis en relación al total. En una población perfectamente sincronizada todas las células se dividen al mismo tiempo y, entonces, el MI es igual a la unidad, mientras que entre dos divisiones es siempre cero ; en este caso, está claro que el tiempo transcurrido entre dos picos de mitosis equivale al período del ciclo. Raramente pueden encontrarse poblaciones completamente sincrónicas en condiciones naturales; las primeras divisiones en la segmentación de los huevos son el ejemplo más típico de población sincrónica natural, sin embargo, pierden la sincronía al cabo de pocas divisiones debido a la variabilidad del período del ciclo entre las células. Salvo que exista algún factor sincronizador que actúe sobre una población, la tendencia espontánea de todas las po-

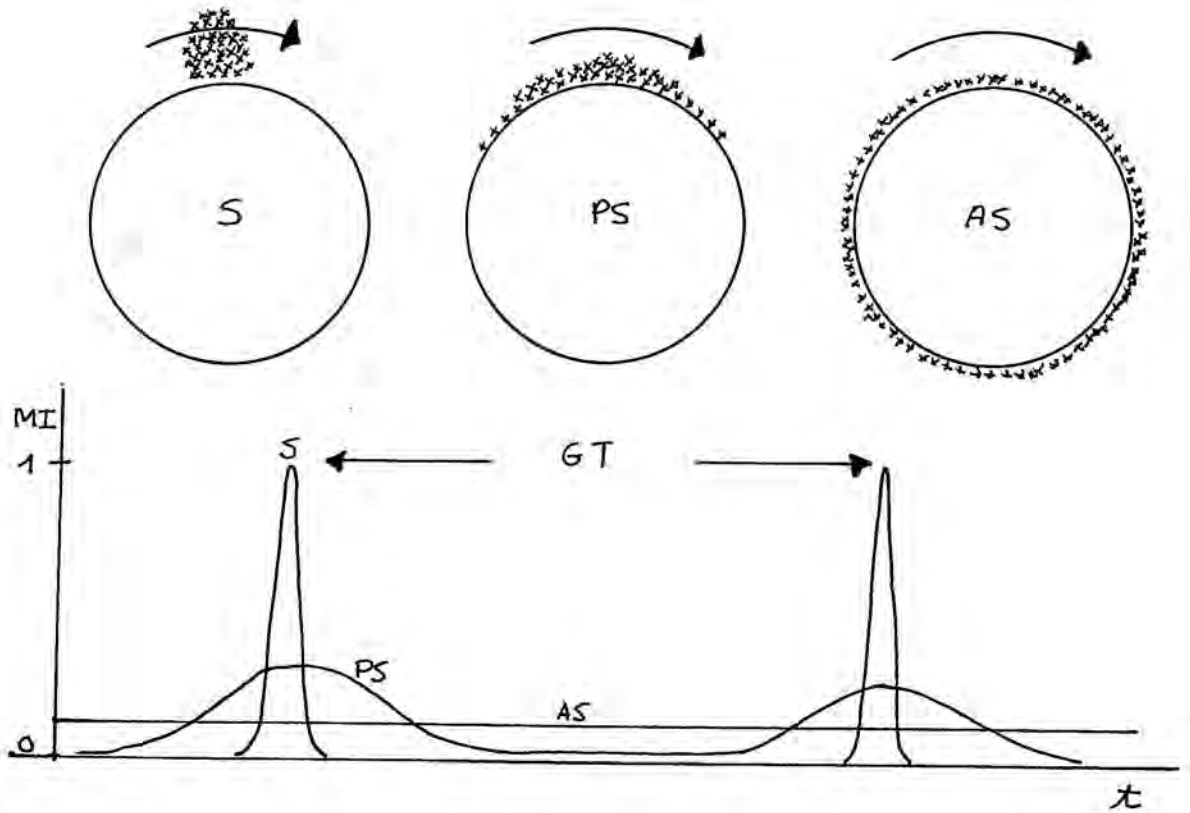


Figura 3 : Esquemas : Distribución de las células de la población a lo largo del ciclo, según el grado de sincronía. **Gráfica :** El índice mitótico (MI) en función del tiempo, poblaciones sincrónicas (S), poblaciones parasincrónicas (PS) y poblaciones asincrónicas (AS).

blaciones es ir perdiendo la sincronía hasta perderla por completo ; también aquí, como en otros sistemas, se cumple el principio termodinámico del máximo desorden. En las poblaciones completamente asincrónicas el MI es constante ya que las células se encuentran distribuidas por todos los puntos del ciclo a un mismo tiempo y la frecuencia de mitosis depende de la relación entre la duración de la mitosis (MT) y la del período del ciclo (GT) (ver 2.1.3.3) pero es independiente del tiempo. La mayor parte de poblaciones celulares in vitro e in vivo son de este tipo. Hay

que hacer, sin embargo, una salvedad : La tendencia espontánea de las poblaciones naturales a la asincronía completa puede estar contrarrestada por factores sincronizadores externos, tales como la oscilación lumínica circadiana. La mayoría de organismos poseen fotorreceptores que les hacen sensibles a las oscilaciones de intensidad lumínica, lo cual repercute en toda su fisiología, con la consiguiente aparición de los ritmos circadianos en diversas actividades fisiológicas. En algunas poblaciones, la reproducción celular viene afectada por este tipo de oscilaciones, con lo cual poblaciones de por sí asincrónicas quedan parcialmente sincronizadas, constituyendo poblaciones parasincrónicas. Estas poblaciones representan una situación intermedia entre la sincronía perfecta y la asincronía ; el MI es oscilante pero raramente alcanza los valores de 1 y 0, sino que se mantiene entre ambos. A parte de las poblaciones naturales con parasincronía circadiana, existen otro tipo de poblaciones parasincrónicas, se trata de poblaciones sincronizadas artificialmente con fines experimentales, que raramente alcanzan una sincronía perfecta y, que por tanto, es más exacto calificarlas de parasincrónicas (ver 2.1.4.2).

La utilización de poblaciones sincrónicas y parasincrónicas para el estudio del ciclo celular es completamente distinta que la de las asincrónicas. Las dos primeras pueden utilizarse como una célula amplificada , que va pasando por los distintos pasos del programa de reproducción ; es decir, al tratarse de una población coherente, permite utilizar una muestra de la población a un tiempo determinado del ciclo como una célula en la situación correspondiente, de manera, que estudiando la composición química de muestras obtenidas a distintos tiempos tendremos una representación de los cambios que sufre una célula a lo largo del ciclo. Por ello, las poblaciones de esta clase son especialmente útiles para el análisis secuencial. Las poblaciones asincrónicas, por el contrario, no pueden utilizarse de la misma forma, si bien su análisis cinético no ofrece dificultades, su análisis secuencial es bastante más complicado (ver 2.1.4.3).

2.1.3 Métodos de análisis cinético del ciclo celular

2.1.3.1 Mediciones sobre una sólo célula aislada a lo largo de su ciclo

Se trata de observaciones dirigidas, generalmente, a la medida de las variaciones en volumen o en peso de una sólo célula durante su ciclo de reproducción. Estos estudios no son aplicables a cualquier tipo de célula, pues se requieren condiciones apropiadas : Así, las mediciones de volumen requieren tipos celulares de morfología regular que permita calcular el volumen a partir de las dimensiones lineales ; este es el caso de la levadura Schizosaccharomyces pombe, que posee una forma cilíndrica y crece por elongación manteniendo el diámetro constante y que, por consiguiente, ha permitido la construcción de curvas de crecimiento volumétrico de una sólo célula (Mitchison 1971).

El peso total no suele medirse, sino más bien, el peso seco mediante microscopía de interferencia o el "peso reducido" (peso en agua), que se obtiene utilizando una microbalanza denominada "buzo cartesiano" y cuyo valor es proporcional al peso seco. La primera técnica ha sido utilizada fundamentalmente por Mitchison y colaboradores y la segunda por Zeuthen (Mitchison 1971).

Este tipo de estudios por las dificultades que entrañan son raramente utilizados, pero, es obvio que constituyen la aproximación más directa al ciclo celular y en casos favorables pueden proporcionar datos de mayor precisión que los obtenidos con poblaciones.

2.1.3.2 Medición del crecimiento de la población

Más arriba hemos expuesto el caso de las poblaciones celulares expansivas en las que, dadas las condiciones de homogeneidad y aislamiento cinéticos, se cumple siempre la equivalencia entre el período de duplicación de la población (DT) y el del ciclo reproductor de sus células (GT).

$$DT = GT \quad (1)$$

En esta situación pueden utilizarse medidas del crecimiento de la po-

blación para el análisis cinético del ciclo.

De no existir interferencias que modifiquen la duración del ciclo celular, una población expansiva crece exponencialmente

$$N = N_0 \cdot \exp (PK \cdot t) \quad (2)$$

donde N es el número de células de la población, N_0 es el número inicial ($t=0$), PK es la constante de proliferación o velocidad específica de crecimiento y t es el tiempo.

La constante de proliferación (PK) tiene la dimensión de inverso del tiempo, es una frecuencia, que mantiene una relación constante con el período de duplicación (DT); en efecto, para $N=2N_0$, $t=DT$; substituyendo en (2) y tomando logaritmos naturales:

$$\ln 2 = PK \cdot DT \quad (3)$$

y de (1) y (3) concluimos:

$$GT = DT = \frac{\ln 2}{PK} \quad (4)$$

La relación (4) es la que usualmente se utiliza para calcular GT a partir de una curva de crecimiento semilogarítmica, en este caso la relación exponencial (2) se convierte en una relación lineal

$$\ln N = \ln N_0 + PK \cdot t \quad (5)$$

donde PK es la pendiente de la recta. Para calcular el período del ciclo celular (GT) a partir del crecimiento de una población expansiva, mediremos el tamaño de la población a diferentes tiempos y representaremos los logaritmos naturales de estos valores en función del tiempo, con lo cual obtendremos una recta cuya pendiente será PK ; utilizando la expresión (4) calcularemos GT a partir de PK .

El problema práctico consiste en cómo medir el crecimiento de la población. Teóricamente la forma más directa de conocer el tamaño de una población es contar su número de células, sin embargo, esto no es siempre practicable. En los cultivos, las células pueden ser suspendidas en

un medio líquido para ser contadas bajo microscopio mediante un hemocitómetro o bien, automáticamente con un contador de células. La medición de un crecimiento in vivo, en un tejido sólido, presenta más dificultades, ya que difícilmente podrá obtenerse una suspensión celular uniforme. En este caso se puede utilizar el peso del órgano correspondiente o la cantidad total de DNA determinable por métodos químicos, como medida del número de células. Desde los trabajos de Vendrely y Vendrely (1949) y de Mirsky y Ris (1949) sabemos que la cantidad de DNA por dotación cromosómica es un valor constante y característico de cada especie biológica. Así, todas las células diploides de una determinada especie tienen la misma cantidad de DNA, que se duplica previamente a cada división celular, sin que ocurran otros cambios independientes de la reproducción celular. Por ello, la medida de la cantidad total de DNA representa con gran exactitud el número de células de la población ya que entre ambos valores existe una relación constante. No puede decirse lo mismo del peso del órgano, que está sometido a variaciones que no dependen del número de células, como el tamaño de las mismas o la cantidad de sustancia intercelular.

Finalmente diremos que la medida del crecimiento da siempre valores globales de GT, no pudiendo discriminar entre las diferentes poblaciones celulares que componen un determinado órgano (por ejemplo, células epiteliales y fibroblastos). Ello supone una desventaja con respecto a los métodos que expondremos a continuación (2.1.3.3, 2.1.3.4 y 2.1.3.5), basados en recuentos microscópicos que si lo permiten.

2.1.3.3 Medición de frecuencias de fase

En una población completamente asincrónica las células se distribuyen por todos los puntos del ciclo y está claro que la proporción de células en una determinada fase del mismo (índice o frecuencia de fase) dependerá de la relación entre la duración de la fase y el período del ciclo (GT). La frecuencia de fase más comunmente medida es la frecuencia de mitosis o índice mitótico (MI) :

Si las células se distribuyen uniformemente por todo el ciclo (dis-

tribución isodensa o rectangular, figura 4a), es decir, la cantidad de células por unidad de "longitud" o tiempo del ciclo es constante, la frecuencia de fase será exactamente igual a la relación entre el tiempo que las células pasan en ella y la duración total del ciclo (GT). Si la duración de la mitosis es MT , la frecuencia de mitosis será :

$$MI = \frac{MT}{GT} \quad (6)$$

El caso simple de la población isodensa sólo se presenta en poblaciones de recambio en las que por cada célula producida otra es eliminada con lo que la población no crece. En cambio, en las poblaciones expansivas con crecimiento exponencial, la distribución celular en el ciclo no es isodensa o rectangular, sino exponencial (figura 4b). La densidad es máxima al inicio del ciclo y desciende exponencialmente hasta la mitad del valor inicial en la mitosis ; esto es debido a que por cada célula que termina el ciclo en la mitosis, dos células inician un nuevo ciclo.

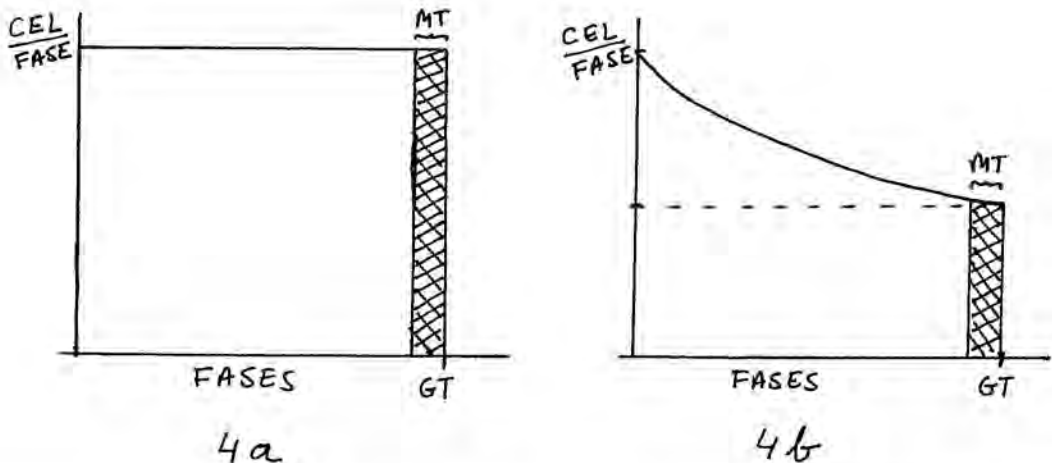


Figura 4 Distribuciones de densidad celular en el ciclo : Distribución isodensa o rectangular (4a) y Distribución exponencial (4b). El área rayada representa el número de células en mitosis, el área total el número total de células de la población.

Varios autores (Smith y Dendy 1962, Johnson 1961, Edwards et als. 1960 Mitchison 1971 y Thomas 1974) han desarrollado la expresión que relaciona la frecuencia mitótica (MI) con el período del ciclo celular (GT) y la duración de la mitosis (MT) en poblaciones celulares de estas características. A continuación damos el desarrollo publicado por Thomas (1974), que a nuestro modo de ver, es el más sencillo y claro :

Sea N el número de células de una población expansiva, asincrónica y homogénea cinéticamente ; el número de células en la población al cabo de un intervalo de tiempo t será :

$$N \cdot 2^{t/GT} \quad (7)$$

donde GT es el período del ciclo. Ya que la entrada en la mitosis no está sincronizada, el número de células en mitosis al tiempo t será igual al número de células que serán añadidas a la población durante un intervalo de tiempo subsiguiente igual a la duración de la mitosis (MT) :

$$N \cdot 2^{t+MT/GT} - N \cdot 2^{t/GT} \quad (8)$$

ya que todas las células en mitosis al tiempo t habrán completado la misma dando lugar, durante este intervalo, a dos células hijas cada una.

La proporción de células en mitosis al tiempo t será :

$$MI = \frac{N \cdot 2^{t+MT/GT} - N \cdot 2^{t/GT}}{N \cdot 2^{t/GT}} \quad (9)$$

Dividiendo numerador y denominador de la expresión (9) por $N \cdot 2^{t/GT}$ obtenemos :

$$MI = 2^{MT/GT} - 1 \quad (10)$$

Trasponiendo términos y tomando logaritmos naturales

$$\ln (MI + 1) = \ln 2 \cdot \frac{MT}{GT} \quad (11)$$

ya que $MI \ll 1$, debido a que la duración de la mitosis es muy corta en comparación con el período del ciclo, podemos realizar la siguiente aproximación :

$$\ln (MI + 1) \approx MI \quad (12)$$

con lo cual la expresión (11) se convierte en

$$MI = \ln 2 \cdot \frac{MT}{GT} \quad (13)$$

que es la relación que buscábamos.

Otro índice de fase que puede medirse es el de la proporción de células sintetizando DNA, esto es, en el intervalo S del ciclo. El índice S (SI) puede medirse mediante autorradiografía de una muestra de la población que ha sido sometida anteriormente a una pulsación de Timidina tritiada, esto consiste en exponer durante unos pocos minutos la población al trazador radiactivo, de modo que únicamente las células que estén sintetizando DNA en el momento de la pulsación incorporen el precursor marcado. Después de revelada la emulsión autorradiográfica podrá distinguirse entre las células marcadas por la Timidina tritiada y las que no lo están, la relación entre las primeras y el total mide el SI.

2.1.3.4 Método del bloqueo mitótico

Se trata de uno de los métodos más clásicos para el análisis cinético del ciclo celular en poblaciones asincrónicas. Su fundamento operacional consiste en la detención de la división celular en la metafase, mediante compuestos químicos adecuados y sin interferir el ciclo en ningún otro punto. A medida que las células van llegando a la mitosis quedan detenidas acumulándose en dicha fase ; midiendo la frecuencia de mitosis (MI) a distintos tiempos podemos conocer la velocidad de circulación o frecuencia del ciclo celular y, por tanto, el valor del período del mismo (GT).

El agente bloqueante más comunmente usado es la Colchicina y su derivado la desacetil-N-metil-Colchicina o "Colcemid" ; otros bloqueantes de la mitosis son los alcaloides de la Vinca (Vinblastina y Vincristina), la Griseofulvina y la Podofilina, habiendo sido usados algunos de ellos en la quimioterapia del cáncer. La Colchicina (ver fórmula en Figura 5) es un alcaloide que se extrae del bulbo y de las semillas del Colchicum autumnalis (azafrán de otoño) y que tiene una historia médica larga en el tratamiento de la gota. Su acción sobre la mitosis fue descubierta por

Pernice en 1889 ; en un trabajo que publicó en "Sicilia médica" sobre sus observaciones histológicas en un perro intoxicado con Colchicina, dió a conocer la acumulación de mitosis bloqueadas en la metafase en el epitelio del estómago y del intestino. Este trabajo pasó desapercibido y no

Figura 5 Fórmula estructural de la Colchicina. Según Lettré 1964.



fue redescubierto hasta 1949 (Eigsti, Dustin y Gay-Winn 1949) cuando la Colchicina era ya utilizada ampliamente como bloqueante mitótico en el análisis cinético del ciclo celular. Hacia los años 30 y 40 la Colchicina empezó a ser utilizada con esta finalidad y entre los años 50 y 60 se publicaron muchos trabajos de análisis cinético, especialmente de poblaciones celulares epiteliales en diversas especies de mamíferos (intestino, estómago, epidermis etc.) (Bertalanffy 1964).

El mecanismo de acción de la Colchicina no es bien conocido, pero hay pruebas suficientes como para admitir que interacciona con las subunidades de Tubulina, impidiendo que éstas se unan entre sí para formar los microtúbulos del aparato mitótico. (Dustin 1964, Taylor 1973). Los otros agentes bloqueantes actúan también impidiendo la formación del aparato mitótico, con lo cual los cromosomas no pueden separarse y la división celular queda detenida en la metafase.

Una condición fundamental que debe cumplir cualquier bloqueante mitótico es que a la concentración necesaria para detener todas las mitosis que se inicien no interfiera la progresión del ciclo en otros puntos ; de lo contrario, se alteraría la velocidad que deseamos medir. Hay que decir

que, unos más otros menos, todos los agentes bloqueantes alteran de algún modo el metabolismo celular produciendo efectos tóxicos. Así, por ejemplo, la Colchicina, el Colcemid y la Vinblastina, que son los más utilizados, inhiben la síntesis de DNA en células embrionarias de rata (encefalo fetal) y, en cambio, no afectan a la de las células de varios tejidos adultos del mismo animal a las dosis correspondientes (Williams 1973). Sin embargo, aun en los casos en que la dosis necesaria para bloquear la mitosis sea tóxica para la síntesis del DNA, el método puede ser utilizado sin merma de fidelidad siempre que la medición se realice en un intervalo de tiempo subsiguiente al comienzo del bloqueo lo suficientemente corto para que no alcance a las células que todavía sintetizaban DNA al iniciar el experimento, es decir, un intervalo igual o inferior a la duración del G2 en el tipo celular correspondiente. En cambio, un efecto tóxico en el G2 invalidaría completamente esta técnica para el análisis cinético.

Debido a la posibilidad de efectos tóxicos, antes de emplear esta técnica en una población celular determinada hay que realizar un estudio de "dosis óptima". La dosis óptima ideal es aquella que es suficiente para bloquear en la metafase el 100 % de las mitosis que se inicien, sin afectar a la velocidad de iniciación. En todo caso, existirá una dosis por debajo de la cual el bloqueo mitótico será incompleto y una dosis máxima, que de ser sobrepasada aparecerán alteraciones indeseables en otros puntos del ciclo. Ya que estos últimos son de tipo inhibitorio, la dosis óptima será aquella en la que la velocidad de acumulación mitótica medida sea máxima. Esto significa que en esta técnica, el error en la medición de la velocidad de circulación o frecuencia del ciclo tenderá a ser por defecto, al alejarnos de la dosis óptima en uno o en otro sentido.

Según Bertalanffy 1964, la dosis óptima para la rata es de 1 microgramo por gramo de peso corporal, utilizando Colchicina ; y el doble para el ratón ; sin embargo, las dosis utilizadas por los diversos autores son bastante variables. Según la literatura que nosotros hemos consultado, las dosis de Colchicina, Colcemid y Vinblastina más utilizadas en ex-

periencias in vivo oscilan entre 1 y 12 microgramos por gramo de peso corporal. En experiencias in vitro se han utilizado dosis más diversas. En la Tabla 1 damos una revisión realizada por nosotros sobre dosificación de los tres bloqueantes mitóticos.

Tabla 1 Dosificación de bloqueantes mitóticos

<u>Bloqueante</u>	<u>Dosis</u>	<u>Situación</u>	<u>Referencia</u>
Colcemid	5,0	in vivo, ratón	Bolding y Laurence 1968
Colcemid	7,5	in vivo, ratón	Elgjo 1975
Colcemid	4,8	in vivo, murciélago	Iversen et als. 1974
Colchicina	1,0	in vivo, rata	Tutton 1974
Colcemid	5,0	in vivo, ratón	Bullough y Deol 1972
Colcemid	7,5	in vivo, ratón	Elgjo y Edgehill 1973
Colchicina	5,0	in vivo, ratón	Frankfurt 1971
Vinblastina	3,0	in vivo, rata	Brøyn 1975
Colchicina	40,5	in vitro, hepatocito de rata	Whitfield et als. 1976
Colcemid	4,0	in vitro, epidermis de ratón	Bullough y Laurence 1961

Los datos de la literatura dados de diversas formas han sido convertidos a microgramos por gramo de peso corporal (situación in vivo) o en microgramos por mililitro de medio de cultivo (situación in vitro). Algunos datos referentes a ratones de 3 meses en los que no figuraba el peso del animal, los hemos convertido tomando un peso de 20 gramos.

Prácticamente, la técnica experimental consiste en inyectar la cantidad adecuada del bloqueante a un lote de animales o de cultivos celulares y tomar muestras del mismo a diferentes tiempos para su fijación y procesamiento histológico. El recuento de la proporción de mitosis en las preparaciones y su representación gráfica permitirán el cálculo del período del ciclo celular y también de la duración de la mitosis.

Para el cálculo, es preciso tener en cuenta la distribución de densidad celular en el ciclo, es decir, si se trata de poblaciones isodensas o

no (ver 2.1.3.3). En una población asincrónica e isodensa (poblaciones de recambio de tamaño constante) la variación del índice mitótico (MI) con el tiempo de acción del bloqueante será lineal :

$$MI = \frac{MT}{GT} + \frac{t}{GT} \quad 0 \leq t \leq GT - MT \quad (14)$$

donde MT/GT es el índice mitótico inicial (MI_0) y t el tiempo de acumulación, por tanto podemos escribir

$$GT = \frac{t}{MI(t) - MI_0} \quad (15)$$

En poblaciones asincrónicas y no isodensas (poblaciones expansivas) la relación correspondiente es exponencial. En efecto, a partir de la relación (10) (página 29) podemos escribir

$$MI = 2^{MT+t/GT} - 1 \quad 0 \leq t \leq GT - MT \quad (16)$$

que puede transformarse en una relación lineal tomando logaritmos naturales

$$\ln(MI + 1) = \ln 2 \frac{MT}{GT} + \ln 2 \cdot \frac{t}{GT} \quad (17)$$

donde $\ln 2 \cdot MT/GT$ es aproximadamente igual al índice mitótico inicial (MI_0), ya que cuando $t=0$, $MI_0 \ll 1$ y entonces $\ln(MI_0 + 1) \simeq MI_0$; teniendo esto en cuenta y despejando GT , se obtiene :

$$GT = \frac{\ln 2 \cdot t}{\ln [MI + 1] - MI_0} \quad (18)$$

La expresión (18) puede ser simplificada de la siguiente manera

$$GT = \frac{\ln 2 \cdot t}{MI(t) - MI_0} \quad (19)$$

siempre que los valores de $MI(t)$ sean muy inferiores a la unidad.

Las curvas experimentales no se ajustan completamente a las relaciones teóricas anteriores debido a que el bloqueante no actúa inmediatamente después de ser inyectado, pues debe difundir a través de más o menos barreras, según los casos, hasta alcanzar el interior de las células donde encontrará el blanco de acción. Existe, por tanto, un retraso o tiem-

po de difusión, que hace que la acumulación de mitosis no sea lineal desde el principio de acuerdo con las relaciones (14) y (17) sino que presenta una curvatura inicial, hasta alcanzar la linealidad con pendiente igual a la que teóricamente se espera (Puck y Steffen 1963, ver Figura 6).

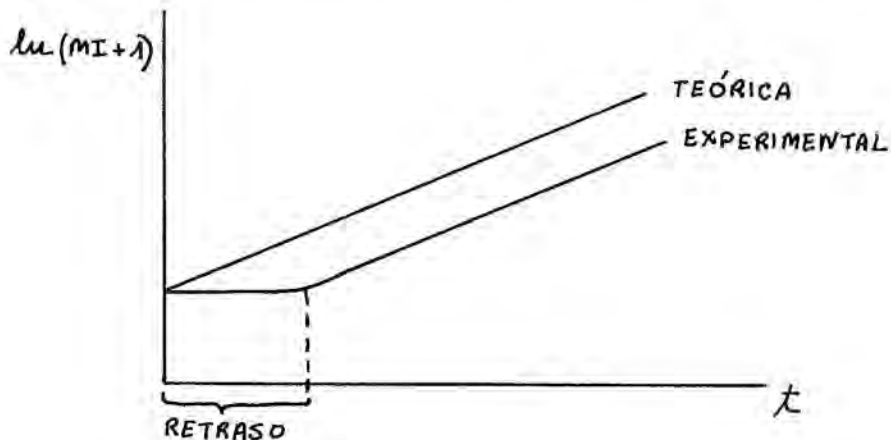


Figura 6 Comparación entre la curva teórica y la curva experimental en un experimento de bloqueo mitótico. Según Puck y Steffen 1963, vuelto a dibujar.

El retraso o tiempo de difusión suele oscilar entre 15 y 30 minutos, según los casos, aunque excepcionalmente puede ser más largo (Bertalanffy 1964). De manera, que si se empieza a medir la acumulación mitótica una vez transcurrido este intervalo, situando en este punto el $t=0$ y el MI_0 , la gráfica experimental se ajustará a las relaciones teóricas. El método del bloqueo mitótico debe ser adaptado a cada sistema, tratando de encontrar el intervalo óptimo para realizar las mediciones: Este intervalo no debe comenzar antes de que el bloqueante haya difundido completamente, pero tampoco conviene alejarlo demasiado del inicio del experimento ya que a la larga aparecerán efectos tóxicos y, por otra parte, si lleváramos la acumulación a tiempos tan largos como GT , es evidente que dado el carácter cíclico del sistema la velocidad de iniciación mitótica disminuiría progresivamente.

El método del bloqueo mitótico permite calcular, asimismo, la duración de la mitosis (MT). En efecto, una vez determinado el período del ciclo (GT), el valor de MT se calculará a partir de la frecuencia mitótica basal (no acumulada) de la población y de GT, utilizando las relaciones (6) ó (13), según la población sea o no isodensa.

Hemos prestado especial atención a esta técnica ya que es la que hemos empleado en nuestros experimentos. Además, junto con el método de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM) que exponemos a continuación son los procedimientos más habituales en el análisis cinético del ciclo celular ; al final del siguiente apartado realizaremos una comparación crítica de ambas técnicas.

2.1.3.5 Método de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM). Comparación crítica con el método del bloqueo mitótico

El método de la frecuencia de mitosis marcadas (abreviado usualmente con las siglas FLM de "fraction of labelled mitoses") es el método más utilizado en cinética celular desde los años 60. El método, en su forma actual, fue descrito por Quastler y Sherman en 1959, aunque lo esencial del mismo ya se encuentra en los trabajos de Howard y Pelc de 1951 y 1953, en ellos, utilizando P-32 como trazador de la síntesis de DNA en células vegetales (raíces de Vicia faba) demostraron que el DNA se sintetiza en un intervalo discreto de la interfase (intervalo S) separado de la mitosis por los intervalos G1 y G2. Quastler y Sherman utilizaron, por primera vez como trazador del DNA la Timidina H-3 que se incorpora con una gran especificidad y diseñaron el método de la FLM que permite medir los cuatro intervalos fundamentales del ciclo.

Esencialmente, la técnica experimental consiste en someter la población celular cuyo ciclo quiere analizarse a una pulsación con timidina H-3, una pulsación es una exposición de las células al trazador de muy corta duración en comparación con la del ciclo celular, en la práctica la pulsación dura unos pocos minutos. Si se trata de una población in vitro, la pulsación puede obtenerse introduciendo el trazador en el frasco de cul-

tivo y renovar el medio al cabo de pocos minutos. En condiciones *in vivo*, en la mayor parte de vertebrados, la timidina H-3 es degradada rápidamente, por lo que a la dosis en que es utilizada usualmente el tiempo efectivo de marcado es inferior a los 30 minutos (Wimber 1963). A distintos tiempos después de la pulsación se obtienen muestras de la población, es decir, distintos frascos de cultivo o distintos animales en las mismas condiciones, y se procesan según la técnica de la Autorradiografía (Baserga y Malamud 1969), para la posterior medida de la frecuencia de mitosis marcadas de cada muestra.

El fundamento operacional del método consiste en suponer que únicamente las células que estén sintetizando DNA durante el corto tiempo de la pulsación habrán incorporado el trazador. En una población asincrónica, donde las células se hallan esparcidas por todo el ciclo, únicamente aparecerán marcadas las células que ocupaban el intervalo S durante la pulsación. Estas células forman una cohorte o grupo sincronizado que irá circulando a través del ciclo de reproducción y cuyo paso por un punto fijo del mismo podrá detectarse. La mitosis es el punto o ventana de observación elegido. Cuando la cohorte celular marcada pase por el intervalo de división celular, las figuras mitóticas aparecerán marcadas en las autorradiografías. Midiendo a distintos tiempos la frecuencia de mitosis marcadas se obtiene una curva oscilante de período constante que refleja los sucesivos pasos de la cohorte celular marcada a través de la ventana de observación: El tiempo transcurrido entre dos ondas equivale a la duración del ciclo celular.

En una población ideal cuyas células se distribuyeran uniformemente por el ciclo (distribución isodensa o rectangular) y cuyos intervalos fueran de duración constante, la curva FLM consistiría en la repetición de una onda trapezoidal (Figura 7) de fácil interpretación: Existe un lapso inicial en el que no aparecen mitosis marcadas, este tiempo mide el intervalo G2, esto es el tiempo desde el final del intervalo S al inicio de la mitosis. Después la frecuencia va aumentando linealmente hasta alcanzar el 100%, el tiempo de esta variación equivale a la duración de la mito-

sis. ya que representa el tiempo que el frente de la cohorte marcada tarda en recorrer toda la ventana de observación. La duración del intervalo de síntesis (ST) viene medida por la "longitud" de la cohorte celular marcada; esta "longitud" puede determinarse midiendo la diferencia de tiempo entre el paso del frente y la cola de la cohorte celular por un mismo punto del ciclo : Si elegimos como punto de referencia el final del intervalo de mitosis, el tiempo que media entre el comienzo de la meseta del trapecoide y el final de la primera onda (FLM = 1 a FLM = 0) mide el intervalo S. Posteriormente aparece una segunda onda idéntica a la anterior que indica que la cohorte marcada y sus descendientes han recorrido un nuevo ciclo y así sucesivamente. La distancia entre dos puntos homólogos de dos ondas consecutivas mide la duración total del ciclo; la diferencia entre este valor (GT) y la suma de los intervalos medidos en la primera onda (TG2 más TM más TS) corresponde a la duración del intervalo que separa a la mitosis del inicio del intervalo S (intervalo G1).

En la práctica la lectura de la FLM se realiza por el método del nivel 0,5 propuesto por Quastler y Sherman. Este procedimiento consiste en trazar una línea paralela al eje de abscisas (t) al nivel correspondiente al 50 % de mitosis marcadas, las intersecciones con la gráfica subdividen a la línea 0,5 en tres segmentos que se corresponden con intervalos o grupos de intervalos del ciclo : El primer segmento, desde el origen a la intersección con la parte ascendente de la primera onda da el valor $G2T + \frac{1}{2} MT$; el segundo segmento, del punto anterior a la intersección con la parte descendente de la primera onda da el valor ST y finalmente el segmento entre esta última intersección y la correspondiente a la parte ascendente de la segunda onda equivale a $GT - ST$, es decir, $G1T + G2T + MT$; (ver figura 7). La razón para utilizar el método del nivel 0,5 en lugar del expuesto en primer lugar es que la mayoría de las veces la gráfica FLM no se ajusta al caso ideal y generalmente nunca se alcanzan valores del 100 % de mitosis marcadas, especialmente en la segunda onda que siempre es más baja y ancha que la primera y no idéntica como en el caso ideal. Estas desviaciones son debidas a la variabilidad de la dura-

ción del ciclo entre las células de la población y a la distribución no isodensa de las células a lo largo del ciclo.

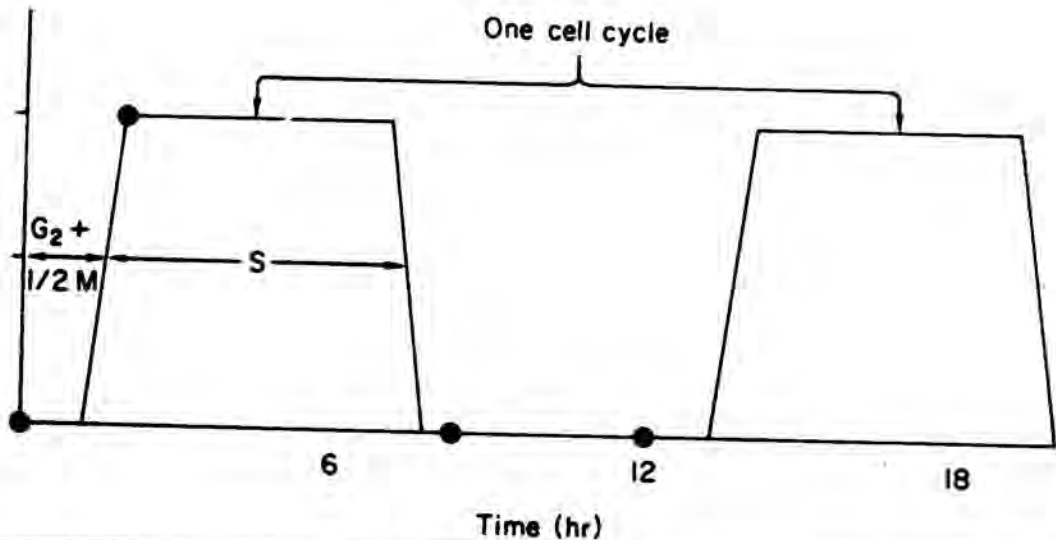


Figura 7 Lectura de la gráfica de frecuencia de mitosis marcadas (FLM). Aquí se representa el caso ideal de una población isodensa de GT igual para todas sus células. El método de lectura de la gráfica corresponde al del nivel 0,5 que es aplicable a las poblaciones reales (ver detalles en el texto). (Tomado de Cameron 1971).

Existen otros métodos de lectura de la FLM más exactos pero más complejos basados en la medición de áreas delimitadas por la gráfica FLM (Mendelsohn y Takahashi 1971) y aun otros, llamados métodos de simulación, como los de Barret (1966), Bronk (1969) y Brockwell, Trucco y Fry (1972) que requieren la construcción de un modelo matemático del ciclo y la utilización de un computador capaz de generar curvas FLM a partir de valores supuestos para los parámetros cinéticos del modelo; la comparación entre la curva formada por los datos observados y las diversas simulaciones permite determinar qué valores de los parámetros se ajustan más a la realidad. Un rasgo común a todos estos modelos es que incorporan un tratamiento estadístico; se parte de una distribución de probabilidad de la duración para

los distintos intervalos que da cuenta de la variabilidad observada en la duración global del ciclo entre unas células y otras dentro de la misma población. Las distribuciones de los diferentes intervalos generalmente se suponen independientes y cada modelo en particular aplica un determinado tipo de distribución de probabilidad (normal, log-normal, recíproca normal, gamma etc.), aunque generalmente, las FLM teóricas generadas a partir de los diferentes tipos de distribución muestran diferencias insignificantes. La interpretación de las gráficas FLM tiene un problema capital de fondo ¿Cuál suponemos que es la estructura cinética del ciclo celular? G.G. Steel (1973) dice textualmente :

" Lo que tratamos de medir en una población celular en crecimiento está determinado por nuestro concepto acerca de los procesos que en ella ocurren, acerca de los mecanismos que tratamos de elucidar. Las mediciones por sí mismas (la duración del intervalo de síntesis de DNA, por ejemplo) son de interés general sólo cuando pueden combinarse con las de otros parámetros en el seno de una teoría que nos ayude a comprender como funciona un sistema biológico. Algunos parámetros, por ejemplo, velocidad de crecimiento, no son ambiguos y a menudo pueden medirse directamente; otros, como ciclo celular, por ejemplo, son apropiados únicamente en el caso de que la población celular real corresponda a un determinado modelo teórico".

En el apartado 2-2, dedicado al intervalo G1 y a los modelos de estructura cinética del ciclo celular, abordaremos este asunto con mayor profundidad y realizaremos una reinterpretación de la gráfica FLM a la luz del modelo de probabilidad de transición.

A pesar de las dificultades que existen para una interpretación rigurosa de los resultados, este método es muy utilizado y ha sido bastante fecundo, ya que a partir del mismo varios autores han desarrollado técnicas derivadas : Como el método de Ordatchenko y cols. (1964) para la medida de la duración de la mitosis in vivo. El de la COFLM o fracción de mitosis marcadas de la cohorte ideado por Koschel, Radley y Hodgson (1977) para el análisis de poblaciones parasincrónicas, como el hígado regenerante. O el de Barranco, Haenelt y Bolton (1977) que es una técnica "rápida"

en la que en lugar del conteo de mitosis marcadas se utiliza la medida por contador de centelleo de la radioactividad global de las células mitóticas previamente aisladas del resto de la población; esta técnica es únicamente aplicable a cultivos celulares. Citaremos finalmente la técnica desarrollada por Gray et als. (1977), en la que se mide la radioactividad por célula en una ventana estrecha del intervalo S (RCSI); este método difiere del de la FLM clásico no solamente en utilizar el contador de centelleo en lugar de la autorradiografía, sino además, en que la ventana de observación del paso de células marcadas no es la mitosis sino un fragmento del intervalo S, que se define por el contenido de DNA por célula en esta parte del ciclo; esta técnica es muy sofisticada ya que requiere la medición del contenido de DNA por célula mediante citofotometría de flujo y la separación de las células con determinada cantidad de DNA mediante un seleccionador celular electrónico.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la FLM y métodos relacionados basados en la utilización de timidina H-3 es el de la posibilidad de artefactos por raditoxicidad o por efectos metabólicos del trazador. La raditoxicidad, en el sentido de producir alteraciones cromosómicas o inhibiciones de la reproducción celular, ha sido afirmada o negada según distintos autores, ello depende del tipo celular, de la dosis y de la técnica utilizada para detectar las alteraciones (Bertalanffy 1964). En un trabajo publicado en Nature, Ehmann et als. (1975) utilizando la microfluorometría de flujo, que permite estudiar la distribución de las células en los intervalos G1, S y G2-M mediante medición directa del contenido de DNA por célula, prueban, sin lugar a dudas, alteraciones de la progresión del ciclo en cultivos en monocapa de fibroblastos de hamster debidas a la exposición de las células a la timidina H-3. Sin embargo, la dosis utilizada por Ehmann y colaboradores en la pulsación de 20 minutos con timidina H-3 es unas 20 veces mayor que la utilizada corrientemente en la FLM (20 microCi/ml y 1 microCi/ml respectivamente) y cuando utilizan dosis comparables lo hacen durante tiempos bastante más largos : En la situación más parecida a las condiciones experimentales usuales de la FLM : 1 microCi/ml y 1 h de exposición (que es varias veces mayor que el tiempo de exposición de las pulsaciones normales) las alteraciones son muy poco importantes. A nuestro modo de ver, en las condiciones en que es utilizada la Timidina H-3

en la FLM (1 micro Ci/g de peso o ml durante unos pocos minutos) no es probable que se produzcan grandes alteraciones cinéticas en la mayor parte de células; con todo, la posibilidad de perturbaciones del ciclo no puede descartarse por completo.

Otra fuente de artefactividad en el método de la FLM puede provenir de los efectos químicos o metabólicos de la timidina y su posible repercusión en la cinética del ciclo; así, Greulich, Cameron y Thrasher (1961) demostraron que la timidina, tritiada o no, estimulaba la actividad mitótica del epitelio duodenal.

En resumen, podemos concluir que la utilización de la timidina H-3 puede producir alteraciones del ciclo, ocasionando errores "instrumentales" en las mediciones de la cinética de reproducción celular. La importancia de estos errores se conoce únicamente en algún caso aislado, ya que la mayor parte de estudios cinéticos en los que se emplea el método de la FLM no van acompañados de otras mediciones que permitirían evidenciar los artefactos.

El método de la FLM junto con el del bloqueo mitótico constituyen el fundamento de la mayor parte de trabajos sobre cinética de la proliferación celular. Por esta razón creemos oportuno cerrar este apartado con una breve crítica comparativa de estas dos técnicas. Sobre este tema existe un trabajo bastante completopublicado por F. D. Bertalanffy en 1964, al que haremos referencia en nuestra discusión.

Hemos tratado anteriormente de la toxicidad y otros efectos indeseables de la timidina H-3, tal como hicimos en el apartado anterior con los bloqueantes mitóticos. En ambos casos hemos mostrado como son posibles artefactos de medición que pueden evitarse realizando un estudio detenido de cada sistema y tratando de dar con las condiciones óptimas de aplicación del método. En el caso de los bloqueantes mitóticos, las condiciones óptimas son las que proporcionan las mediciones más altas de velocidad o frecuencia del ciclo, ya que siendo inhibitoria, y nunca estimulante, la acción tóxica de estos agentes, los errores han de ser siempre por defecto de acumulación de mitosis y nunca por exceso. En el caso de la timidina H3

la situación es diferente ya que pueden producirse efectos inhibitorios por radiotoxicidad o efectos estimulantes por la adición de timidina a las células; en este caso la mejor medición no es necesariamente la de valor más alto. La mejor manera de averiguar el error en los estudios cinéticos es aplicar ambos métodos al mismo sistema y comparar los resultados. Bertalanffy (1964) en el trabajo a que hemos hecho referencia anteriormente compara resultados de una y otra técnica en el mismo sistema y encuentra que, en general, las diferencias no suelen ser mayores que las observadas al aplicar la misma técnica al mismo sistema en distintos laboratorios; no puede, por tanto, decirse que una técnica sea más exacta que la otra, sin embargo, al comparar ambas técnicas son evidentes ventajas y desventajas relativas :

Desde el punto de vista estrictamente técnico, la FLM resulta un método bastante más complicado y más largo, ya que requiere la práctica de la autorradiografía; en este sentido el método de los bloqueantes mitóticos resulta más ventajoso por su asequibilidad, simplicidad y rapidez. Sin embargo, una vez obtenida la preparación, el contaje de la FLM es menos engorroso que el de la frecuencia mitótica.

Por lo que se refiere a los resultados, la información obtenida con la FLM es más completa que la que proporciona el método del bloqueo mitótico, en este último únicamente pueden determinarse la duración global del ciclo y la de la mitosis, mientras que la FLM permite conocer, además, la de los intervalos G₁, S y G₂. Sin embargo, la interpretación de los datos de la FLM es mucho más complicada e indirecta, ya que no existe un método de lectura de la gráfica que no presuponga un determinado modelo del ciclo; en cambio, el método de los bloqueantes mitóticos proporciona un único dato "crudo", pero perfectamente definido: La velocidad específica o frecuencia de circulación, a partir de la cual puede calcularse directa y simplemente la duración media del ciclo celular de la población; en poblaciones cinéticamente homogéneas el valor GT medio proporcionado por el método del bloqueo mitótico coincidirá con el obtenido a partir de la FLM, ello no es así en el caso de poblaciones inhomogéneas donde existan

diferencias de la duración del ciclo entre las células, sea esto debido a una variación continua o a la existencia de subpoblaciones cinéticamente distintas; en tal situación el método de los bloqueantes proporcionará siempre el valor medio de GT, mientras que la FLM, tal como es interpretada generalmente, dará un valor inferior, próximo al GT de la subpoblación de crecimiento más rápido, aunque ello depende del modo como se utilice la segunda onda en las mediciones.

De todo lo anterior se puede concluir, a grandes rasgos, que el método de los bloqueantes mitóticos resulta más objetivo que el de la FLM, pero éste último proporciona mayor cantidad de información.

2.1.4 Métodos de análisis secuencial del ciclo celular

2.1.4.1 Mediciones celulares individuales

Observar una célula desde su nacimiento hasta su división y realizar mediciones sobre la misma sin interferir en sus funciones es, sin lugar a dudas, la forma más directa de analizar el ciclo celular. Sin embargo, esta clase de estudios es poco frecuente ya que resultan muy largos y engorrosos y permiten medir únicamente magnitudes globales como volumen, masa seca, peso reducido, respiración etc.

La medición de volumen es una de las más sencillas de realizar, bien sea mediante observación microscópica directa o a partir de fotografías. Una condición imprescindible es que la célula tenga forma de un sólido de revolución, entonces es posible calcular el volumen realizando simples mediciones de longitud. Los valores absolutos de volumen sólo pueden ser calculados en células esféricas o en células con paredes rígidas como las de los vegetales y algunos microorganismos. Sin embargo, en células con formas menos regulares pueden obtenerse volumetrías relativas a partir de mediciones lineales siempre que la forma de la célula no se modifique durante su crecimiento. Las medidas de volumen son más precisas en células que crecen en una sola dirección, como los bacilos y algunas levaduras, que en células que crecen en tres dimensiones.

La mayor parte de las células animales poseen formas irregulares y su volumen no puede calcularse a partir de mediciones microscópicas. En algunos casos, adoptan formas más o menos esféricas y entonces puede calcularse su volumen a partir del diámetro, aunque con poca precisión. Desde hace unos diez años existe una técnica no microscópica que permite medir el volumen de células de forma irregular : Se basa en los contadores electrónicos de partículas en los que puede registrarse un cambio de resistencia eléctrica al pasar una célula a través de una estrecha rendija, que resulta ser proporcional al tamaño de la célula. Las células pueden hacerse pasar muy rápidamente a través de la rendija de medida, con lo que es posible realizar en pocos minutos la volumetría de miles de células. Este método no carece de dificultades técnicas que han sido discutidas por Harvey 1968 y Kubitschek 1969. Sin embargo, en la práctica este método no es aplicable a una misma célula a lo largo del ciclo sino a poblaciones celulares sincronizadas (obtención del volumen medio) o asincrónicas (obtención de la distribución de frecuencias de volúmenes).

Otra propiedad que puede medirse ópticamente sin daño alguno para la célula viva es la masa seca total, mediante microscopía de interferencia. El principal problema de este método consiste en la integración de las mediciones, ya que si bien resulta sencillo medir la masa seca por unidad de superficie en una determinada parte de la célula, resulta mucho más complejo determinar la masa seca total integrada sobre toda la célula (Mitchison 1971).

El buzo cartesiano, desarrollado en el laboratorio Carlberg de Copenhague, es otra microtécnica que puede ser aplicada a células individuales vivas. Se trata de una pequeña esfera hueca de vidrio en comunicación con un largo capilar; encima de la esfera una copa de poliestireno sirve de soporte para la célula. El buzo va sumergido en una solución salina fisiológica dentro de una cámara de flotación, cuya presión puede ser controlada. Mediante el control de la presión de la cámara puede regularse el grado de expansión de la burbuja de aire que ocupa la esfera del buzo. Ajustando cuidadosamente la presión, el buzo puede situarse en una determina-

da posición; una vez cargado el buzo con una célula, éste se hundirá proporcionalmente a su peso en el agua, la descompresión que hace falta aplicar a la cámara para conseguir que el buzo recupere su posición inicial es una medida del peso "reducido" (peso en el agua). Los cambios en esta última magnitud son proporcionales a las variaciones de la masa seca. Esta técnica ha sido utilizada por Zeuthen (1961) entre otros. Además de su utilización como balanza, el buzo cartesiano puede servir de respirómetro (Holter 1961).

2.1.4.2 Mediciones sobre poblaciones sincronizadas

La utilización de poblaciones natural o artificialmente sincronizadas hace posible la aplicación del análisis bioquímico al ciclo celular. Después de los estudios celulares individuales, los experimentos con poblaciones celulares sincronizadas constituyen la manera más directa de analizar el ciclo de reproducción. La mayor parte de datos referentes a modificaciones de la cantidad o de la velocidad de síntesis de los diferentes componentes celulares a lo largo del ciclo han sido obtenidos en poblaciones sincronizadas.

La principal dificultad de esta metodología consiste precisamente en conseguir poblaciones sincrónicas: Las poblaciones celulares naturales raramente lo son, si exceptuamos el caso de poblaciones iniciales en algunos desarrollos embrionarios. La sincronía debe obtenerse, por tnato, artificialmente y, aun entonces, una vez obtenida resulta difícil mantenerla ya que las poblaciones sincronizadas tienden espontáneamente a la pérdida de la sincronía (ver figura 8). El motivo de esta tendencia será tratado en el apartado 2.2, en relación a la estructura cinética del intervalo G1 del ciclo celular.

Los métodos para la sincronización celular pueden dividirse en dos grupos: Métodos de selección y métodos de inducción.

Los métodos de selección, tal como su nombre indica, consisten en separar de una población asincrónica aquellas células que se hallen en una determinada parte del ciclo. La separación o selección se basará en algu-

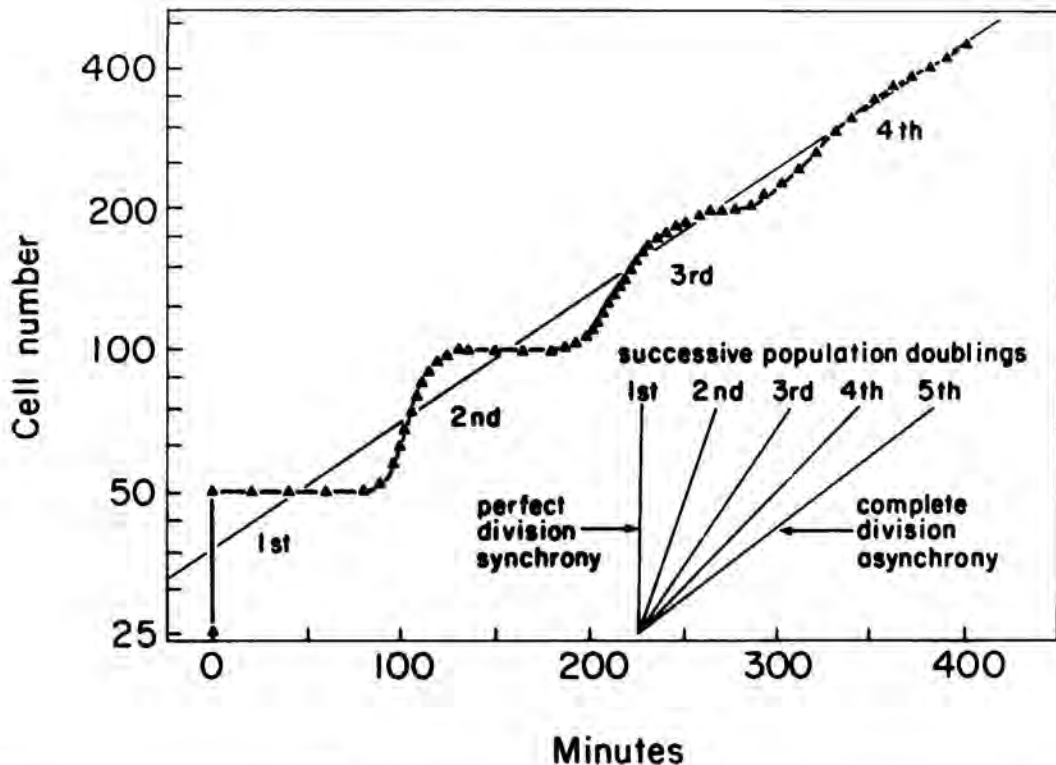


Figura 8 Gráfica de crecimiento de un cultivo de *Tetrahymena* sincronizado mediante selección individual de células en división. Observar la pérdida progresiva de la sincronía, que prácticamente desaparece al llegar el cultivo a la cuarta generación. Tomado de Prescott (1976).

na propiedad física de las células que sufra modificaciones ostensibles a lo largo del ciclo, permitiendo diferenciar unas células de otras según su posición en el mismo, como el tamaño celular (métodos de selección por velocidad de sedimentación) o la adhesividad de las células a superficies sólidas (métodos de selección mitótica). La ventaja de los métodos selectivos está en que no producen modificaciones del ciclo y por ello son preferibles a los métodos inductivos, aunque no siempre son fáciles de poner en práctica.

Los métodos inductivos consisten en someter una población asincrónica a

un bloqueo en algún paso del ciclo, de modo que al llegar a su umbral todas las células queden detenidas en el mismo. Los procedimientos que han sido utilizados para el bloqueo son varios, choques de calor, inhibidores de la síntesis de DNA de RNA o de proteínas, privación de aminoácidos o de suero, inhibidores de la mitosis etc. Tienen la ventaja sobre los procedimientos selectivos de que son fácilmente aplicables y dan siempre buenos rendimientos, pero presentan el serio inconveniente de producir artefactos de desfase en muchos casos. Así, por ejemplo, aunque mediante la inhibición de la síntesis de DNA se concentren las células en el umbral del intervalo S, la sincronización puede que sea únicamente aparente ya que otros cambios del ciclo celular pueden ocurrir independientemente de la síntesis del DNA con lo que seguirán aconteciendo y la población no será realmente sincrónica en todos sus aspectos. Es evidente que tales artefactos pueden proporcionar imágenes equivocadas del programa del ciclo. Por esta razón los métodos inductivos van siendo, cada vez más, substituidos por los métodos selectivos (Mitchison 1971).

2.1.4.3 Utilización de poblaciones asincrónicas para el análisis secuencial

La metodología de poblaciones sincronizadas que acabamos de describir es, con mucho, la más utilizada en los estudios del programa biosintético del ciclo celular. Su aproximación al mismo es clara, directa y no requiere la construcción de artificios matemáticos para la interpretación de los resultados experimentales. Menos populares, más indirectas y teóricamente más complejas son las técnicas de análisis secuencial que utilizan poblaciones asincrónicas. A primera vista no resulta evidente como estas últimas pueden dar información en este campo, pero, de hecho, pueden darla. En efecto, resulta técnicamente posible medir, célula por célula, la cantidad de diversos componentes químicos, utilizando técnicas citoquímicas y la microespectrofotometría; bien sea recorriendo una superficie representativa de una preparación microscópica o bien, haciendo pasar a través del dispositivo de medida una suspensión celular, fraccionada en pequeñas go-

tas (microgotas) que contengan una célula como máximo (microfotometría y microfluorometría de flujo). El resultado de este tipo de mediciones consiste en una distribución de frecuencias en la que se expresa el número de células que presentan una determinada cantidad del componente que se ha medido. Conociendo, por otro lado, la distribución de densidad celular en el ciclo es posible derivar el patrón de crecimiento o duplicación del componente estudiado a lo largo del ciclo reproductor. La principal dificultad teórica estriba en que la distribución de densidad celular en el ciclo no es un dato experimental, sino una consecuencia del modelo cinético que se ha utilizado como hipótesis de trabajo. Sin embargo, si por otro procedimiento, población sincrónica por ejemplo, puede determinarse directamente el patrón de duplicación de un determinado componente, entonces la distribución de frecuencias de la cantidad de dicho componente en una población asincrónica permitirá poner a prueba la adecuación del modelo cinético adaptado.

Esta metodología fue desarrollada inicialmente por Walker (1954) y Walker y Richards (1959) y también por Vendrely en diversos trabajos (ver Vendrely 1971), aplicándola al estudio del patrón de síntesis del DNA, pero puede ser aplicada a cualquier otro componente siempre que se cumplan las siguientes condiciones: La población debe crecer exponencial y asincrónicamente, la cantidad del componente estudiado no debe decrecer en ningún punto del ciclo y el aumento de dicha cantidad durante un ciclo ha de ser conocida (generalmente se trata de una duplicación).

Los aspectos teóricos de estos métodos han sido especialmente tratados por Jones (1974) y por Gray (1974 y 1976). Este último autor utilizando la microfluorometría de flujo ha construido distribuciones de frecuencias de DNA/célula en distintas poblaciones y condiciones experimentales. Mediante simulación con computador ha derivado distribuciones teóricas a partir de un modelo matemático del ciclo basado en el propuesto por Kendall (1948) que se compone de una secuencia de transiciones sucesivas con probabilidades definidas. Comparando las distribuciones experimentales con las teóricas, pueden hallarse los valores de los parámetros del modelo que

generan resultados mejor ajustados a la realidad.

2.1.4.4 Utilización de métodos de bloqueo y de mutantes condicionales del ciclo celular para la determinación de puntos de transición

El análisis secuencial de ciclo celular es también abordado mediante estudios en los que la secuencia del ciclo ha sido detenida en puntos definidos mediante sometimiento de la población celular a condiciones determinadas. Todos los puntos en los que se ha mostrado posible detener la progresión del ciclo se denominan puntos de transición y se admite que en ellos ocurren cambios indispensables para la prosecución de la secuencia del programa de reproducción, de manera, que si se bloquea dicho paso por uno u otro medio el programa quedará interrumpido.

La detección de puntos de transición puede realizarse empleando inhibidores metabólicos, especialmente de la transcripción y de la síntesis proteica (Mueller y Kajiwara 1966, Buck et als. 1967), irradiación ionizante (Doida y Okada 1969) o, también, más recientemente, bloqueando específicamente con condiciones de baja concentración de suero o falta de isoleucina en el medio de cultivo. Así, por ejemplo, utilizando este último procedimiento, Yen y Pardee (1977) han conseguido detectar dos puntos de transición en el intervalo G1 de fibroblastos 3T3: Las bajas concentraciones de suero en el medio de cultivo bloquean el ciclo de estas células unas 2 h antes del comienzo de la síntesis del DNA, mientras que la privación de isoleucina lo hace en dos puntos distintos, uno al final del G1 y otro en el intervalo S tardío.

Existe todavía otra posibilidad de bloquear la progresión del ciclo en lugares específicos aprovechando la existencia de mutantes condicionales. Se trata de líneas celulares mutantes termosensibles caracterizadas por crecer a una determinada temperatura, denominada temperatura permisiva, y quedar detenidas a otras temperaturas en las que las células normales crecen bien (temperaturas no permisivas). El bloqueo es reversible pudiendo proseguir de nuevo si las células son reintegradas a la temperatura permisiva.

Esta metodología ha sido utilizada con éxito en levaduras por Hartwell y colaboradores (mutantes *cdc* de *Saccharomyces cerevisiae*, ver Mitchison 1974) y en algas unicelulares (mutantes *Cb* en *Chlamydomonas reinhardtii*) por el grupo de Howell, ver Howell (1974). En células de mamíferos también ha sido aplicada, aunque los resultados sean menos brillantes, por Roscoe et als. (1973) en una línea celular de hamster que crece normalmente a 37°C pero que es incapaz de iniciar la síntesis de DNA a 40°C, deteniéndose el ciclo unas horas antes del intervalo S cuando se cultivan las células a dicha temperatura; y, también, por Burstin et als. (1974) que han obtenido un mutante termosensible a partir de células BHK (riñón de mono recién nacido) que queda bloqueado en G1 en un punto que precede al del bloqueo por hidroxiurea.

La combinación de los distintos métodos de bloqueo en un mismo tipo celular ha de permitir la disección de la secuencia del ciclo, resolviéndola en una serie de puntos de transición. Aunque tales transiciones vienen definidas, en su mayor parte, de forma completamente empírica y no es evidente un trasfondo molecular definido, debe reconocerse que constituyen un primer paso hacia el esclarecimiento del problema. Uno de los casos donde la aplicación de las diversas técnicas de bloqueo ha proporcionado mayor información es el de *Schizosaccharomyces pombe*, donde el grupo de Mitchison, en diversos trabajos (ver revisión en Mitchison 1974), ha analizado el ciclo celular de esta levadura, llegando al concepto de una doble secuencia: Por los resultados de los experimentos de bloqueo puede inferirse que en este tipo de célula el ciclo se compone de dos secuencias relativamente independientes que funcionan en paralelo. El bloqueo de una de ellas no afecta, al menos por algún tiempo, a la otra. La primera secuencia se denomina "ciclo de división" y se compone principalmente de la síntesis del DNA, la división nuclear, la división citoplasmática y varios puntos de transición. La segunda es el "ciclo de crecimiento" que incluye la síntesis de RNA y de proteínas, presentando patrones tanto continuos como periódicos (en escalón o en pico). En diversos experimentos muestran como el bloqueo de una secuencia no afecta a la otra: Así, por ejemplo,

el tratamiento con hidroxiaurea, que inhibe la síntesis de DNA, produce un retraso en el ciclo de división pero no modifica la cronología del patrón de duplicación de tres enzimas ensayados (la aspartatotranscarbamilasa, la ornitinatranscarbamilasa y la alcoholdehidrogenasa). De manera inversa, la privación de toda fuente de nitrógeno inhibe la síntesis proteica y el crecimiento es menor, sin embargo, las células pueden dividirse a su debido tiempo, dando lugar a una progenie de tamaño inferior al normal. Estos resultados nos parecen muy importantes ya que dan idea de la complejidad del programa de reproducción, irreductible a una simple secuencia.

2.2 El intervalo G1

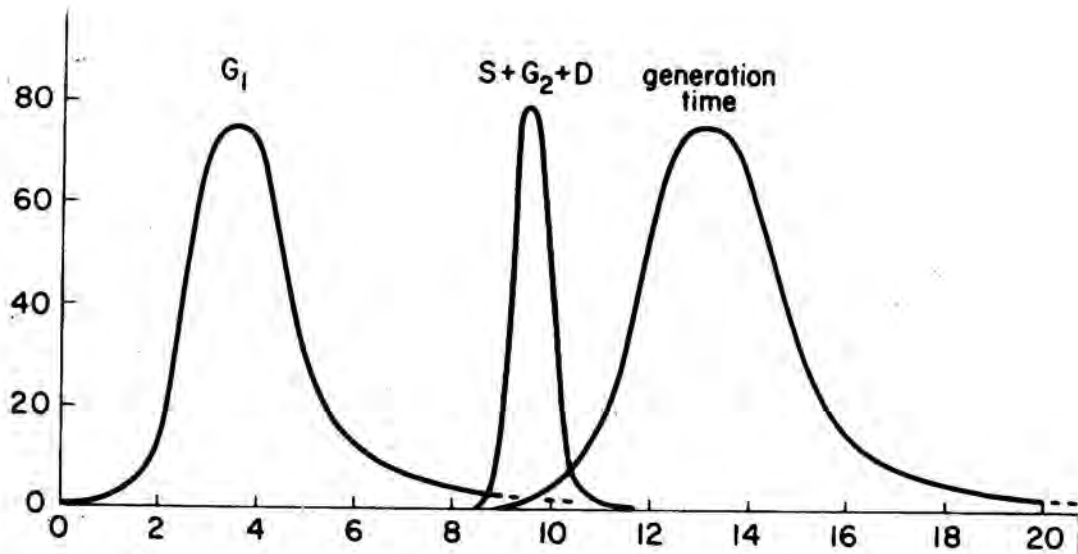
La división clásica del ciclo celular en los intervalos G1, S, G2 y M atiende a los procesos de duplicación y división cromosómicas, de modo, que los intervalos S y M quedan definidos de modo positivo por las operaciones de síntesis de DNA y de histonas el primero de ellos y por la condensación y separación de las cromátidas el segundo. En cambio, los intervalos G1 y G2 se definen, especialmente el primero, de forma negativa. Durante el intervalo G1, la cantidad de DNA del núcleo se mantiene constante e igual al valor diploide propio de la célula postmitótica; la lectura de la FLM no indica otra cosa que la existencia de un intervalo de tiempo más o menos prolongado entre la división celular y la iniciación de un nuevo período de duplicación cromosómica. La cuestión fundamental sobre el intervalo G1 es de si se trata simplemente de un compás de espera o si durante el mismo tienen lugar pasos necesarios del ciclo de reproducción celular, como la síntesis de determinadas proteínas o acumulación de activadores de la síntesis de DNA, o, simplemente, crecimiento celular global, cuyo desarrollo condicione otros pasos más tardíos del ciclo. El problema es más complejo y en G1 caben, probablemente, composiciones mixtas de compases de espera y pasos de programa. En lo que sigue de este apartado y en el siguiente, dedicado a los modelos estadísticos del ciclo, desarrollaremos la base experimental y conceptual de esta idea.

Un primer aspecto que destaca en la consideración de datos acerca del intervalo G1 es el de la extremada variabilidad de su duración al comparar distintas poblaciones celulares (tabla 2) o diferentes células de una misma población (figura 9). La variabilidad del intervalo G1 resulta especialmente interesante si se la compara con los demás intervalos del ciclo, que es mucho menor (figura 9). Una consecuencia de este hecho es que las diferencias de duración del ciclo celular entre células o entre poblaciones celulares son debidas generalmente al intervalo G1, ya que la suma de las duraciones de los restantes intervalos varía muy poco (alrededor de 10 h en células de mamífero, pudiendo oscilar de 8 a 12 h según el tipo de célula).

Tabla 2 Duración del ciclo celular y de sus intervalos fundamentales

Animal and cell population	G ₁ (hr)	S (hr)	G ₂ (hr)	M (hr)	T (hr)
From studies on adult mice					
Duodenum crypt	4.5-5.5	5	~2.0	—	11.5
Duodenum crypt	3.6	7.4	1.5	0.7	13
Jejunum crypt	1-2	8	1.5	—	11.2
Small intestinal crypt	9.0	7.5	1.5	1.0	19
Forestomach epithelium	30	9-10	1-2	1-2	43
Uterine epithelium (castrated)	31.5	8.5	1.0	1.0	42
Uterine epithelium (castrated and estrogen treated)	18.5	5.5	1.0	1.0	26
Vaginal epithelium (estrus)	15.4	7.6	~1	~1	25
(diestrus)	62.5	7.5	~1	~1	72
Hair follicle	2.8	6.0	2.0	—	10.8
Ear epidermis	~22 days	30	6.5	3.8	24 days
Ear epidermis	7-80	18	3.5	2.0	30-100
Antibody forming	1	6.8	0.7	0.5	9
Tongue epithelium	17	7	2	1.0	27
Esophagus epithelium	171.5	6.9	1.5	1	181
Esophagus epithelium	75	7.2	4.1	0.7	87
Abdominal epidermis	139	6.2	5.3	0.5	151
Forestomach	156	6.9	4.1	1.0	168
Adrenal cortex	1863	7.5	—	—	1875
From studies on young mice (20 gm)					
Duodenum crypt	5	5.9-6.7	1.0	1.3	10-13.3
Jejunum crypt	2.8-3.8	5.8-6.1	0.9	0.6	10.1-13.8
Ileum crypt	—	6.2-6.3	0.6	0.8	10.5-11.4
Colon crypt	13.5	6.3-6.4	1.1	0.7	21.7
Pharynx epithelium	75	5.0-6.0	1.2	1.8	84
From studies on mice embryos					
Embryonic tail	1.2	6.3	1.5	—	9
Embryo neural tube	2.3	4.0	0.8	1.3	8.4
Trophoblasts of 8-day placenta	—	7.0	—	—	9.4
Trophoblasts of 12-day placenta	—	6.5	—	—	15
From studies on mouse gonadal cells					
Spermatogonia type AII	7.5	7.5	14.0	—	28-30
Spermatogonia type AIII	8.0	8.0	11.0	—	26-28
Spermatogonia type AIV	9.5	13.0	8.0	—	30-31
Spermatogonia type (intermediate)	8.5	14.0	6.0	—	26-28
Spermatogonia B	10.5	18.0	4.5	—	29-30

Duración global del ciclo celular (T) y de los intervalos G₁, S, G₂ y M en horas, cuando no se indica otra cosa. Diferentes poblaciones celulares de ratón in vivo. Tomado de Cameron 1971.



en ordenadas Nº de células y en abscisas tiempo (horas)

Figura 9 : Comparación de la variabilidad de la duración del intervalo G_1 , de la de la suma de S, G_2 y M y de la del ciclo completo (GT) en células de ovario de hamster *in vitro*. Las dos curvas de la derecha se han obtenido midiendo individualmente la duración del ciclo mediante fotografías a intervalos ("time-lapse") y la distribución de valores para la suma S más G_2 más M a partir de la gráfica FLM. La curva de la izquierda (distribución de G_1) se obtuvo de la diferencia entre las otras dos. Tomado de Prescott 1976.

El intervalo G_1 es considerado como la parte del ciclo en la que tiene lugar la regulación de la frecuencia del mismo, es decir, de la velocidad de reproducción celular. Esta idea resulta directamente de las anteriores consideraciones sobre la variabilidad de dicho intervalo.

Otro dato a tener en cuenta es la existencia de poblaciones celulares donde la duración del intervalo G_1 puede alcanzar valores medios desproporcionadamente altos en comparación con el orden de magnitud de los demás intervalos.: Ninguno de los tres intervalos restantes suele durar en ningún caso más de 10 horas, en cambio el intervalo G_1 llega, a veces, a

varias decenas de horas e incluso a varios días (tabla 2).

Atendiendo al principio de economía de medios, reiteradamente comprobado en los biosistemas, parece poco probable que estas dilataciones tan considerables del intervalo G1 sean debidas a un aumento en el número de pasos del programa de reproducción y, tanto más, cuanto que a lo largo de estos G1 tan prolongados no se detectan cambios importantes que indiquen un progreso del programa. Es más sencillo admitir que en el intervalo G1 de algunas poblaciones celulares existe un estado "de reposo" en el que la célula desarrolla diversas actividades metabólicas que le son propias pero no progresa en su programa de reproducción, podría decirse que se ha retirado temporalmente del ciclo celular (figura 10). Este concepto fue introducido por Lajtha en 1963, quien siguiendo la nomenclatura establecida para los intervalos del ciclo, denominó a este estado "de reposo" estado G₀. Lajtha se basó especialmente en la cinética de la regeneración hepática: En esta situación las células hepáticas, que raramente se reproducen en el mamífero adulto, empiezan a sintetizar DNA de una forma altamente sincronizada unas 15 horas después de haber practicado una hepatectomía parcial. La entrada sincrónica de las células en el programa de reproducción no es consistente con la idea de que los hepatocitos adultos estuvieran esparcidos a lo largo de un prolongado intervalo G1, que a consecuencia del estímulo se encogiera hasta 15 horas; en este caso, las células entrarían asincrónicamente en el intervalo S, unas tras otras, según su posición en el intervalo G1. El hecho de que esto no sea de esta manera, se comprende admitiendo que antes de la hepatectomía todas las células estaban detenidas en el mismo punto del ciclo y que el estímulo ha provocado la salida de las células de este estado "de reposo" y su entrada en una fase preparativa para la síntesis de DNA, que durará el mismo tiempo en todas las células. Tanto en condiciones naturales como en cultivos celulares se han identificado diversas poblaciones detenidas en dicho estado, que son susceptibles de ser reconducidas al ciclo celular por el estímulo específico apropiado a cada caso. En la tabla 3 (tomada de H^aberg 1976, reordenada) se relacionan varias poblaciones celulares G₀

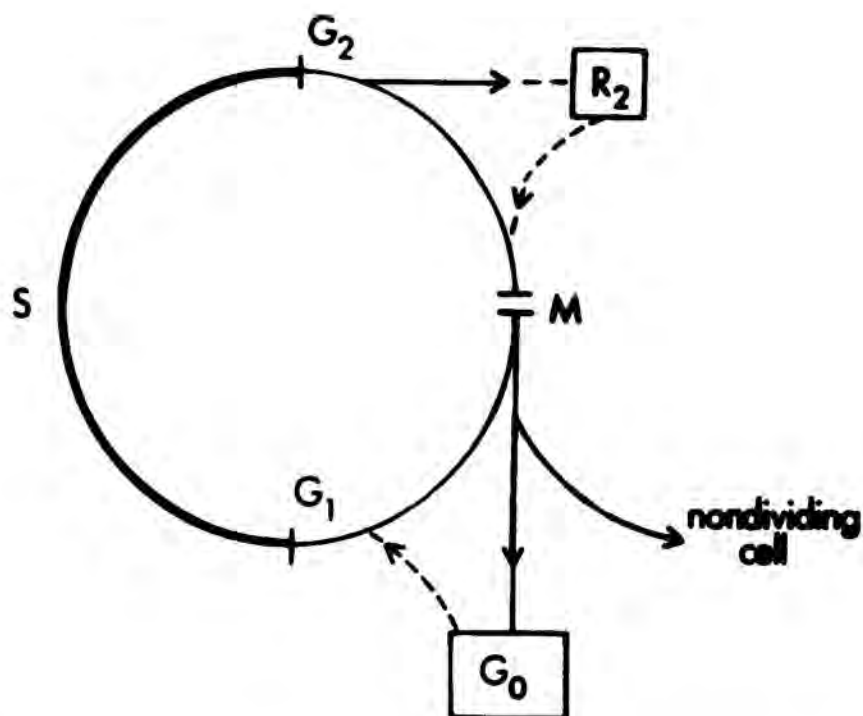


Figura 10 : Esquema del ciclo celular en el que se representan dos posibles estados "de reposo", uno en G1 (estado G₀) y otro en G2 (estado R₂). Además de estas desconexiones reversibles del programa de reproducción, la célula puede abandonar el ciclo definitivamente. Tomado de Baserga 1976.

in vivo con los correspondientes estímulos. Todo apunta, por tanto, al concepto de que cuando una célula abandona definitiva o temporalmente el ciclo de reproducción lo hace en el intervalo G1. Sin embargo, existen casos en los que esto puede ocurrir en G2, se trata de poblaciones "en reposo" tetraploides (R₂ en la figura 10). El caso más conocido de este tipo de poblaciones en los animales es el de la epidermis del ratón (Gelfant 1963 y 1975), con todo, es una situación poco corriente.

Dado por probado que el largo intervalo G1 de algunas poblaciones celulares es, en parte, un compás de espera en el que la célula no está,

Tabla 3 Estimulación de la proliferación en poblaciones celulares quiescentes in vivo

ORGANO	ANIMAL	ESTIMULO
Hígado	Rata y Ratón	Hepatectomía parcial
Hígado	Rata	Triyodotironina
Hígado	Rata en ayunas	Dieta con mucha proteína
Hígado		Deplección de Albúmina
Utero	Rata y Ratón	Estrógenos
Glándula salival	Rata y Ratón	Isoproterenol
Riñón	Rata	Acido fólico
Riñón	Rata y Ratón	Nefrectomía contralateral
Riñón	Rata	Acetato de plomo
Glándula mamaria	Ratón	Estrógenos
Glándula mamaria	Conejo	Prolactina
Cartílago de crecimiento	Rata	Hormona de crecimiento
Piel	Ratón	Aceite de crotona Etilfenilpropiolato
Bazo	Ratón	Eritropoyetina
Suprarrenales	Cobaya	ACTH
Páncreas	Rata	Etionina
Páncreas	Ratón	Glucagon más Triyodotironina
Próstata	Rata castrada	5-alfa-dihidrotestosterona

Tomado de Baserga 1976 y reordenado por órganos, en el trabajo citado se dan además las referencias correspondientes a cada caso de la tabla.

realmente, avanzando en su programa de reproducción, hemos de preguntarnos sobre las actividades propias del Gl. Esto es, ¿ Qué pasos de dicho programa tienen lugar entre la mitosis y la iniciación de la síntesis del

DNA cromosómico ?. A lo largo de toda la interfase la célula crece, acumulando sus diversos componentes químicos hasta duplicar la masa celular. Aplicando la pregunta anterior al crecimiento global de la célula, la cuestión está en si es necesario o no un determinado crecimiento mínimo durante el intervalo G1 para que se inicie la síntesis de DNA. Los datos experimentales que poseemos, al menos en células animales, son contradictorios :

Killander y Zettemberg (1965 a y b) en fibroblastos de ratón *in vitro* (células L) realizaron mediciones individuales de la duración del G1 y del incremento de masa celular durante este intervalo. Llegaron a la conclusión de que cuanto menor era una célula postmitótica mayores eran la duración del G1 y el crecimiento durante el mismo. De manera, que la variabilidad de tamaño celular era mayor entre células postmitóticas que entre células al principio del intervalo S. Estos resultados apuntan a la necesidad de un tamaño celular mínimo para la iniciación del intervalo S y permiten explicar la variabilidad del intervalo G1 por la de los tamaños celulares después de la mitosis : La imprecisión en la división citoplasmática sería la fuente fundamental de la variabilidad del intervalo G1, ya que el tamaño de la célula naciente condicionaría el tiempo de crecimiento necesario para alcanzar el valor mínimo requerido para la iniciación de la síntesis de DNA.

Sin embargo, estas conclusiones no pueden aceptarse como definitivas, ya que no han sido confirmadas por otros experimentos : Fox y Pardee (1970) abordaron el problema con una metodología distinta a la de carácter citoquímico utilizada por Killander y Zettemberg. Obtuvieron células mitóticas por selección a partir de un cultivo de células de hámster y posteriormente las fraccionaron en grupos según el tamaño celular mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll. Cultivaron los distintos grupos por separado y midieron la duración del G1. La correlación entre tamaño celular postmitótico y duración del G1 fue relativamente baja, no permitiendo, según los resultados obtenidos, explicar la variabilidad del G1 por la del tamaño celular postmitótico:

La aparente discrepancia de los resultados comentados no permite, por ahora, conocer claramente la relación entre el tamaño celular y la duración del intervalo G1 en células animales. Sin embargo, si examinamos críticamente los dos tipos de metodologías utilizadas por Killander y Zettenberg y por Fox y Pardee respectivamente, deberemos concluir que los resultados de los dos primeros autores podrían estar más cerca de la verdad, ya que las técnicas empleadas por dichos autores consistían únicamente en realizar mediciones a posteriori, es decir, en células fijadas de la cantidad de DNA/núcleo con técnicas citoquímicas o mediciones durante el crecimiento celular como la determinación de la masa seca mediante microscopía de interferencia o la determinación de la edad celular por el procedimiento de las fotografías a intervalos; en ambos casos, resulta arduo pensar que tales procedimientos puedan alterar el crecimiento o la progresión del ciclo. En cambio, las técnicas de selección mitótica y centrifugación en gradientes utilizadas por Fox y Pardee comportan una mayor manipulación de las células antes de iniciar las mediciones, siendo, por tanto, más probable la producción de artefactos.

Por otro lado, si atendemos a los resultados obtenidos en procariotas y en eucariotas inferiores, la importancia del tamaño celular para la determinación de la duración del G1 es innegable. El modelo experimental sobre el que existe mayor cantidad de información relativa a crecimiento y división celular es la levadura Saccharomyces cerevisiae, donde la dependencia entre tamaño celular y duración del ciclo ha sido claramente demostrada. En experimentos de cultivo de S. cerevisiae en condiciones de baja concentración de nutrientes, la distribución de masa entre la célula parental y la yema se hace de forma muy desigual, resultando células hijas de tamaño extremadamente pequeño en comparación al de las progenitoras; con este procedimiento se consiguen divisiones celulares muy desiguales. Al añadir medio rico en nutrientes se ha observado que el tiempo que media entre la adición del nuevo medio y la iniciación de un nuevo ciclo celular está inversamente relacionado con el tamaño celular inicial (Johnston, Pringle y Hartwell 1977). Otros experimentos (ver Hartwell y Hunger 1977) muestran que los ciclos una vez iniciados pueden continuar

sin crecimiento, indicando que el crecimiento hasta un tamaño determinado es una condición requerida para un único paso del ciclo. Este paso sensible al tamaño celular en S. cerevisiae ha sido localizado en G1 en la proximidad del paso controlado por el gen cdc28 ; este gen controla la duplicación del corpúsculo polar del huso, que precede a la iniciación de la síntesis de DNA. En la proximidad de este paso se detienen las células cuando se encuentran en un medio de cultivo en el que falte algún componente esencial; también se detienen en dicho punto las células haploides en presencia del factor de apareamiento, lo cual permite la sincronización de ciclos celulares previa al apareamiento. El paso controlado por el gen cdc28 es, por tanto, decisivo en el ciclo celular de S. cerevisiae y ha sido denominado punto de arranque ("start"), porque controla la entrada de las células en el programa de reproducción (Hartwell y otros 1974). La correlación entre tamaño celular después de la división y duración del intervalo G1 ha sido comprobada en estas mismas células. Cultivándolas en presencia de cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, que al igual que el cultivo en medio de baja concentración de nutrientes, determina desigualdades de tamaño celular entre la célula parental y la hija producida por gemación (Hartwell y Unger 1977).

De la información proporcionada en los trabajos revisados se puede concluir que en algunos tipos de células el crecimiento celular durante el intervalo G1 hasta un tamaño mínimo es una condición indispensable para la iniciación de la síntesis del DNA cromosómico. En eucariotas inferiores, especialmente levaduras, esta afirmación está sólidamente apoyada por la evidencia experimental, mientras que en células animales existen más dudas al respecto.

Después del estudio del crecimiento global de la célula durante el intervalo G1 es lógico intentar un análisis de sus componentes. La necesidad de un crecimiento mínimo durante el G1 para la prosecución del ciclo no significa, probablemente, que una cierta cantidad de todos los componentes celulares sea imprescindible para el inicio de la síntesis de DNA. Los factores propiamente responsables se hallan seguramente enmascarados entre

los demás con los que "crecen" conjuntamente. Una segunda etapa en el estudio del G1 ha de consistir, por tanto, en analizar la información que existe sobre la progresión del ciclo en G1 y la síntesis de determinados componentes necesarios para la iniciación de la fase de síntesis de los componentes cromosómicos. Aunque no faltan datos experimentales sobre este problema, la información que proporcionan es demasiado "cruda" y dispersa para permitir una imagen racional y generalizada del programa del ciclo en el intervalo G1. No tenemos siquiera una idea aproximada del número de pasos de que consta dicho programa, ya que como antes hemos comentado la variabilidad de la duración de este intervalo es enorme. Hemos agrupado la información disponible en cuatro grupos según la clase de aproximación experimental utilizada :

- 1- Fusión celular heterofásica
- 2- Actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de DNA en poblaciones celulares sincronizadas
- 3- Análisis de puntos de transición : Utilización de inhibidores de la síntesis de RNA y de proteínas. Privación de nutrientes esenciales (AA y suero). Obtención y estudio de mutantes termosensibles de ciclo celular
- 4- Cambios en la membrana celular, en las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos y en las proteínas de la cromatina

Desarrollaremos aquí los puntos 1 a 3 y dejaremos el 4 para otra parte del capítulo, ya que la mayor parte de trabajos del cuarto grupo se refieren al ciclo completo y no específicamente al intervalo G1.

La fusión celular heterofásica consiste en provocar, mediante virus Sendai inactivado o polietilenglicol, la fusión celular entre poblaciones previamente sincronizadas y marcadas que se hallen en fases distintas del ciclo celular. Con este planteamiento experimental Rao y Johnson (1970) han demostrado en células HeLa la existencia de factores inductores de la síntesis de DNA en células en fase S que provocan la iniciación de la misma en núcleos de células en G1, cuando se realiza la fusión entre células de estas dos fases, dependiendo la intensidad de la inducción de la proporción en la célula multinucleada de núcleos S en relación a núcleos G1.

Por otra parte, ni los núcleos en G1, ni los núcleos en G2 producen efectos inhibitorios sobre la síntesis de DNA en núcleos S. La conclusión que los autores sacan de sus resultados experimentales es que en el control intracelular de la iniciación de la síntesis de DNA no intervienen inhibidores durante las fases G1 y G2, sino que se trata de un control positivo, el factor responsable del cual aparece en las células al principio del intervalo S.

Es muy verosímil suponer que el G1, especialmente el final del G1, sea una fase del ciclo dedicada a la síntesis o a la activación de aquellos enzimas que participan en la biosíntesis del DNA o de sus precursores. Por esta razón diversos autores han medido actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de DNA, como la Timidilato sintetasa, la Desoxicitidindeaminasa, la DNapolimerasa etc. en poblaciones celulares sincronizadas (ver Prescott 1976). No se ha podido comprobar que ninguna de estas actividades enzimáticas aumente antes de la iniciación de la síntesis de DNA; el patrón más corriente es un aumento simultáneo de las mismas conjuntamente con la iniciación del intervalo S. La correlación entre inicio de síntesis de DNA y aumento de la actividad de los precursores puede ser explicada en sentido contrario al propuesto inicialmente, esto es, la síntesis de DNA no se inicia a consecuencia de la abundancia de precursores determinada por el aumento de actividad de los enzimas que intervienen en su producción, sino al revés, el consumo de deoxinucleósido trifosfatos en la síntesis de DNA provocaría una disminución de la concentración de precursores que tendría un efecto liberador sobre la actividad de las nucleósido reductasas sometidas a control negativo por los precursores del DNA. Esta interpretación se basa en los estudios realizados por Moore y Hurlbert (1966) sobre la regulación de la biosíntesis de los deoxirribonucleótidos, en células del tumor ascítico de Novikoff. En este trabajo muestran que los deoxirribonucleótidos inhiben la reducción de los ribonucleótidos: Así, el dTTP, el dUTP, el dGTP y el dATP inhiben la reducción de los ribonucleótidos de citidina y de uridina, el dGTP y el dATP inhiben la reducción del GDP y el dATP inhibe la reducción del ADP. Es,

por tanto, una hipótesis razonable es admitir que la actividad, o incluso la síntesis de las reductasas que producen los desoxirribonucleótidos y también de otros enzimas relacionadas con la síntesis de DNA estuviera sometida a una represión por los desoxirribonucleótidos, la cual disminuiría con el consumo de precursores durante la síntesis del DNA cromosómico.

De la exposición anterior podemos concluir que las variaciones de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de DNA ocurren durante el intervalo S y no antes. No pueden, por tanto, considerarse parte del G1 tardío ni como cambios desencadenantes de la transición de G1 a S, ya que estos cambios de actividades enzimáticas son, con mayor probabilidad, una consecuencia que una causa de la iniciación de la fase de síntesis de DNA.

La tercera vía de aproximación experimental al estudio del programa del G1 reúne varios tipos de experimentos que pueden ser denominados conjuntamente por el concepto de "Análisis de puntos de transición". En la parte 2.1.4.4 del capítulo dedicado a métodos de estudio del ciclo celular hemos ya introducido el concepto de punto de transición y los métodos para su identificación. Nos limitaremos ahora a profundizar algo más en la estructura formal de este tipo de análisis y a revisar los principales resultados generalizables de su aplicación al G1. Pringle (1978) ha publicado un trabajo teórico sobre esta metodología con aplicación especial al análisis mediante mutantes termosensibles de ciclo celular, la mayor parte de los cuales se detienen en G1 a la temperatura no permisiva. En primer lugar, distingue entre mapa temporal y mapa de secuencia funcional, mientras el primero es una simple ordenación temporal de acontecimientos del ciclo, el segundo concepto se refiere a una secuencia determinística de eventos, siendo este último el objetivo del análisis de puntos de transición. Otro concepto a destacar es el de marea o señal diagnóstica ("diagnostic landmark"), que se define como el primer paso detectable del ciclo que queda suprimido cuando el mutante termosensible se halla a la temperatura no permisiva. La marea diagnóstica en el caso del G1 será la iniciación de la síntesis de DNA. El punto de transición del programa interrumpido no tiene necesariamente que coincidir con la marea diagnóstica,

sino que, en general, se encontrará antes. Dicho punto coincidirá con el intervalo de síntesis o con la entrada en función del producto de un determinado gen, según que el mutante termosensible tenga alterada, a la temperatura no permisiva, el proceso de síntesis, o bien, la actividad funcional del producto necesario para la transición. El fenotipo terminal de las células después de permanecer algún tiempo a la temperatura no permisiva no puede identificarse propiamente como el estado de la célula en el umbral del punto de transición, no es un corte en el tiempo del ciclo ya que la detención de una secuencia no impide que otras, circulando en paralelo con independencia, sigan avanzando; así, por ejemplo, muchos mutantes que no consiguen iniciar la síntesis de DNA a la temperatura no permisiva siguen creciendo. El fenotipo terminal corresponde, por tanto, a una imagen desfigurada, que no puede identificarse con el estado de la célula en ningún punto del ciclo. Por último define Pringle el concepto de punto de ejecución como aquel punto del ciclo que una vez sobrepasado, el mutante puede proseguir normalmente la secuencia del ciclo a la temperatura no permisiva. El punto de ejecución es aquel tiempo del ciclo en el que la función, dependiente de la temperatura en el mutante, ya ha sido realizada, es decir, que el producto codificado por el gen mutante ya no es necesario a partir de este punto y la síntesis de DNA y la división celular tendrán lugar de todas formas. A nuestro modo de ver, el trabajo de Pringle es una valiosa aportación: El esquema formal que hemos revisado brevemente es indispensable para un planteamiento experimental correcto y para una interpretación de resultados libre de errores groseros. Aunque pensado específicamente para la utilización de mutantes termosensibles, puede servir sin modificaciones importantes para los otros procedimientos de análisis de puntos de transición, como la utilización de condiciones restrictivas de nutrientes o el caso de inhibidores de la síntesis proteica o de RNA. Las marcas diagnósticas utilizadas dependen del tipo celular, pero las más corrientes son la síntesis de DNA y la división celular o algún cambio morfológico asociado a esta última. El análisis de puntos de transición por el método de los mutantes termosensibles está más desarrollado en eucariotas inferiores que en células de organismos pluricelulares, principalmente en

Saccharomyces cerevisiae (Mitchison 1974 y Hartwell 1974) y en Chlamydomonas reinhardi (Howell 1974). En células animales los resultados están mucho más dispersos ya que se han utilizado muy diversas líneas celulares. Entre los trabajos que utilizan el método de los mutantes termosensibles que han permitido localizar puntos de transición en G1 hemos revisado el de Naha, Meyer y Hewitt (1975) en fibroblastos de ratón (clon aneuploide BALB/3T3) el que presentan 8 mutantes distribuidos entre cuatro puntos de transición. En este trabajo se expone un método sencillo para el aislamiento de los mutantes termosensibles de ciclo celular que consiste en cultivar las células a 33°C y después pasarlas a 38°C añadiendo dosis altas de Timidina tritiada o de Bromodesoxiuridina con el fin de eliminar a las células normales que se reproducen a 38°C. Los mutantes aislados se sitúan en un mapa temporal según el tiempo que tardan en iniciar la síntesis de DNA al bajar la temperatura a 33°C una vez acumuladas las células en el punto de transición mediante incubación por tiempo suficiente en las condiciones no permisivas (38°C). Otro trabajo parecido es el de Flores, Ashihara y Baserga (1978) en el que estudian un mutante termosensible (ts 13) obtenido de la línea de riñón de hámster recién nacido (BHK) en el que estudian la entrada de las células en la fase S en diferentes condiciones de cultivo, determinando la posición del punto de ejecución en cada caso: Encuentran que en todas las condiciones la distancia entre el punto de ejecución y la entrada en la fase de síntesis de DNA es la misma (3,2 h). En el mismo trabajo estudian los autores la capacidad del mutante ts 13 para estimular la síntesis de DNA del núcleo de eritrocito de pollo en heterocariones ts 13/ eritrocito: El mutante ts 13 puede estimular la síntesis de DNA en el núcleo de eritrocito a la temperatura permisiva (34 °C) pero es incapaz de hacerlo a 39°C. Este resultado concuerda perfectamente con la hipótesis del iniciador de la síntesis de DNA, no específico de tipo celular, que en el mutante no sería sintetizado o lo sería en una forma inactiva a la temperatura no permisiva; el eritrocito de pollo completamente diferenciado carecería de este iniciador, pero permanecería sensible al mismo pudiendo iniciar la síntesis de DNA si se fu-

siona con una célula capaz de producirlo.

No existe en la actualidad un mapa de secuencia funcional de puntos de transición generalizable a todas las células animales, y ni siquiera de un determinado tipo celular. Sin embargo, de los experimentos de bloqueo realizados con inhibidores de la síntesis proteica o de RNA o mediante condiciones de cultivo de baja concentración de suero o de aminoácidos esenciales se pueden sacar algunas conclusiones que se admiten válidas para la mayor parte de células (Prescott 1976) : La iniciación de la réplica del DNA no puede ocurrir si la mayor parte de la síntesis de RNA y proteica durante el G1 es bloqueada. La inhibición selectiva de la síntesis de RNA ribosómico mediante bajas concentraciones de Actinomicina D al principio del G1 retrasa la iniciación de la síntesis de DNA (Epifanova 1975) y no lo hace si el tratamiento con Actinomicina D se realiza durante el G1 tardío (Rickinson 1970). De modo que la producción de nuevos ribosomas es necesaria para que la célula pueda atravesar la primera parte del G1 pero no es necesaria la síntesis de rRNA para la parte final. Igualmente es necesaria la síntesis ribosómica para la reversión del estado G₀ (Epifanova 1975). El paso a través del G1 es mucho más sensible a la privación de aminoácidos esenciales o a los inhibidores de la síntesis proteica que cualquier otra parte del ciclo. Muy bajas concentraciones, a nivel de trazas, de aminoácidos como la leucina o el triptófano son suficientes para que las células avancen normalmente a través de los intervalos S, G2 y M, pero no para que lo hagan a través del G1. En algunos casos, la detención en G1 de células animales por condiciones restrictivas o inhibidores biosintéticos se ha localizado con precisión en puntos específicos : Por ejemplo, Yen y Pardee (1977) han descubierto dos puntos de transición en el G1 de células animales (línea de fibroblastos de ratón 3T3), el primero está situado 2 horas antes de la iniciación del intervalo S y viene definido por la detención específica en este punto en condiciones de baja concentración de suero y el segundo se halla al final del G1 y en el se detienen las células cuando el medio de cultivo carece de isoleucina.

Al terminar esta exposición general del intervalo G1 conviene tener

presente que la vaguedad de la significación fisiológica de este intervalo viene aumentada por la existencia de algunos tipos celulares que carecen por completo de intervalo G1. La mayoría corresponden a los eucariotas inferiores como Amoeba proteus, el mixomiceto Physarum, la levadura Scchizosaccharomyces pombe; en todos estos casos estas células carecen regularmente de G1, la réplica del DNA cromosómico comienza inmediatamente después de la división celular o nuclear. En los protozoos ciliados Euplotes y Tetrahymena el ciclo reproductor del micronúcleo carece de G1 mientras que el del macronúcleo posee un G1 bien definido (Prescott 1976). En estos ciclos con falta sistemática de intervalo G1, probablemente es el intervalo G2 el que desempeña sus funciones reguladoras. Así como el ciclo convencional "G1-S-G2-M" la célula toma en G1 "la decisión" de duplicar sus cromosomas y en G2 de dividirse, en estos ciclos sin G1 ambas "decisiones" serían tomadas en G2, bien sea en dos puntos distintos o en el mismo punto. En el caso de Amoeba proteus la iniciación de la síntesis de DNA está estrechamente unida a la división precedente y no ha sido posible dissociar ambos eventos mediante bloqueos biosintéticos. Prescott y Rao han hallado que la Actinomicina D administrada en G2 dos horas antes de la división celular inhibe a esta última y también a la síntesis de DNA del siguiente ciclo (prescott 1976). No ha sido posible demostrar la existencia de un punto en el que la administración de Actinomicina D inhibía a una sólo de las dos señales diagnósticas, esto debe ser interpretado admitiendo que con respecto a la síntesis de RNA necesaria para ambos acontecimientos los puntos de ejecución son coincidentes, o bien, que división celular y síntesis de DNA están, en este tipo celular, en una misma secuencia funcional, siendo la primera la causa de la segunda.

En células animales la falta sistemática de G1 se ha encontrado en la epidermis de la hidra, donde el G2 es extremadamente largo, de 24 a 72 horas (David y Campbell 1972), lo cual indica que seguramente desempeña una función reguladora de la frecuencia del ciclo de modo semejante al caso de Amoeba. Los demás casos de células animales sin G1 que se citan habitualmente en la literatura (blastómeros durante la segmentación de hue-

vos de erizo de mar, Xenopus, ratón etc., eritroblastos y mieloblastos, células del tumor ascítico de Eherlich) representan, en realidad, poblaciones celulares en condiciones de hiperestimulación para el crecimiento. A nuestro modo de ver, no se trata de una falta sistemática de G1, en el sentido de un programa del ciclo constituido definitivamente así como en los casos anteriores, sino ciclos con G1 de duración extremadamente corta prácticamente inapreciable pero capaz de dilatarse al cambiar las condiciones "ambientales". Esto es, en efecto, lo que ocurre a lo largo del desarrollo en el caso de las poblaciones embrionarias citadas. Los modelos estocásticos del ciclo celular y, especialmente, el modelo de probabilidad de transición de los que nos ocuparemos seguidamente permiten explicar racionalmente esta enorme flexibilidad temporal del intervalo G1.

2.3 El modelo de probabilidad de transición y otros modelos estocásticos del ciclo celular

2.3.1 Introducción comparativa de las diferentes aproximaciones estadísticas al ciclo celular

Los modelos estocásticos, es decir, no determinísticos del ciclo celular han ido surgiendo a partir de los años 60 como un medio necesario para explicar la cinética de reproducción de las poblaciones celulares. La extremada variabilidad de la duración del ciclo y especialmente del intervalo G1 entre células de la misma población requiere un tratamiento estadístico de la proliferación celular. Se trata de un enfoque formalmente parecido al de la Mecánica estadística, en relación a los conjuntos de partículas de los que se ocupa la Física : En este caso, no se describe el movimiento individualizado de las partículas sino la distribución de probabilidad de los movimientos. Así, por ejemplo, en relación al conjunto formado por las moléculas de un gas, la estadística de Maxwell-Boltzmann describe la distribución de energías, de cantidades de movimiento y de velocidades moleculares. La ley de distribución de Maxwell-Boltzmann permite conocer la frecuencia o probabilidad de una determinada "clase cinética" de moléculas y su modificación en función de la temperatura. De forma análoga, el tratamiento estadístico de la cinética reproductiva de poblaciones celulares describirá la distribución de probabilidad de densidad celular en las distintas fases del ciclo, o bien, la distribución de probabilidad de la duración de las fases.

La mayoría de modelos estocásticos del ciclo celular han sido ideados con el objeto de interpretar adecuadamente las curvas FLM (Frecuencia de mitosis marcadas tras un pulso de timidina H-3). La interpretación de la gráfica FLM según el método del nivel 0,5 ideada por Quastler y Sherman (1959) es válida únicamente para una población ideal en la que las duraciones de los intervalos sean constantes e iguales para todas las células de la población ; en este caso, la gráfica adopta la forma de una función periódica constituida por una serie de trapecoides coherentes. Las pobla-

ciones reales pueden aproximarse más o menos al caso ideal, con lo que el error de lectura de la gráfica será de menor o mayor cuantía. Sin embargo, a partir de los parámetros $G1T$, ST , $G2T$ y MT , por más aproximados que sean a los valores medios nunca podrá generarse una FLM teórica coincidente con la real sino se tiene en cuenta la distribución estadística de los parámetros.

Otra fuente experimental que ha motivado la construcción de modelos estocásticos del ciclo celular son las mediciones individualizadas de la duración del ciclo (GT) en cultivos celulares, mediante fotografías a intervalos ("time-lapse"). A partir de estas mediciones se pueden construir distribuciones de frecuencia de GT que constituyen las referencias reales con las que deberán compararse las distribuciones teóricas derivadas de los modelos.

A grandes rasgos, los trabajos que hemos revisado sobre teoría estadística del ciclo celular pueden agruparse en dos grandes clases que se corresponden aproximadamente con las dos fuentes experimentales de este tipo de estudios, las gráficas FLM y las mediciones individualizadas de GT . Aunque los dos caminos han conducido a conclusiones lo suficientemente semejantes para permitir una unificación de los conceptos fundamentales, la información cruzada entre ambos tipos de trabajo es muy escasa. A primera vista, esto puede parecer sorprendente, pero lo es menos si se consideran las características diferenciales entre ambos tipos de trabajo.

Los trabajos del primer grupo, basados en la interpretación de la FLM, son enormemente teóricos y como tales han sido publicados, en su mayoría, en revistas especializadas en aplicaciones matemáticas a la Biología. La estructura de los modelos de este grupo es relativamente compleja y adolece de una desproporción entre el grado de desarrollo teórico y la base experimental que le sostiene. Cada modelo supone unos parámetros hipotéticos, por ejemplo, el número de subfases de cada intervalo fundamental, y "busca" una combinación de valores correspondientes a dichos parámetros que permita calcular una curva FLM lo más ajustada posible a la experimental. Por regla general, la discusión sobre el fundamento físico del mode-

lo, en términos bioquímicos es pasada por alto o tratada muy superficialmente. Estas consideraciones "negativas" de estos trabajos deben ser balanceadas con su indudable valor en tanto que ofrecen un repertorio de soluciones posibles, a la espera de una mayor penetración experimental que permita entresacar las más adecuadas. Por el momento, diferentes modelos dan cuenta igualmente bien de las FLM reales, este es su defecto y su virtud.

En el segundo grupo nos encontramos con un tipo de trabajo completamente distinto. Su carácter es más experimental, generalmente la cuidadosa elaboración de distribuciones de frecuencias de duración del ciclo celular mediante fotografías "time-lapse", y el componente teórico es más simple y de tamaño más ajustado al de la parte experimental. Estos trabajos están concentrados alrededor del "modelo del G0 o de probabilidad de transición" y han sido publicados en revistas menos especializadas, por lo que cabe suponer una mayor difusión. La mayor simplicidad de las hipótesis y la importancia que tiene la discusión sobre el posible fundamento molecular del modelo en algunos de estos trabajos, ver por ejemplo Smith y Martin (1974), contribuye a darles un mayor enraizamiento físico que a los del primer grupo de carácter mucho más teórico.

Otro aspecto que diferencia ambos tipos de trabajo es el grado de generalidad de los modelos. Los trabajos del primer grupo son más generales y por ello, de gran amplitud y ductilidad, mientras que los del segundo lo son menos. La razón de esta diferencia radica en que los primeros se mueven en un nivel muy teórico en el que hay más libertad de movimientos, en cambio los otros, ajustados a un plano más experimental, desarrollan esquemas más simples con menos hipótesis y mayor rigidez.

2.3.2 Modelos estadísticos para la interpretación de la FLM

En el primer grupo, los trabajos de Barrett (1966) y de Takahashi (1966) encabezan dos líneas de modelos estocásticos del ciclo celular, una puramente estadística (Barrett) y la otra estadístico-analítica (Takahashi). El modelo de Barrett y los de su línea suponen distribucio-

nes de probabilidad de duración de las distintas fases del ciclo (G1, S, G2 y M) a partir de las cuales derivan FLM teóricas que pueden ajustarse más o menos a las reales según los valores medios y el tipo de distribución adoptados para la duración de cada fase. La serie de modelos iniciada por Takahashi tiene, a nuestro juicio, mayor profundidad: Se basan en el modelo multicompartimental de Kendall (1948) adaptado a los cuatro intervalos fundamentales del ciclo, que son a su vez subdivididos en un número hipotético de subfases. Se supone una determinada cinética de transición de un compartimento a otro, definida por la probabilidad de transición, a partir de la cual y del número de subfases de cada intervalo puede derivarse una distribución de probabilidad de densidad celular para las diferentes partes del ciclo. Estas distribuciones permiten predecir el paso a través del ciclo de la cohorte celular marcada por un pulso de timidina H-3 y por tanto, derivar la FLM teórica que deberá confrontarse con la experimental.

Barrett (1966) asume para cada intervalo del ciclo (G1, S, G2 y M) una distribución de probabilidad. Las distribuciones de probabilidad de los cuatro intervalos se suponen independientes. Ensayó tres tipos de distribución: Normal, recíproca-normal y log-normal. Las curvas FLM teóricas se obtienen mediante un programa Monte Carlo para computador. Los métodos Monte Carlo consisten en la resolución de problemas sometiendo números aleatorios a procesos numéricos. Para cada grupo de células (generalmente 2000) se generan números aleatorios con una distribución determinada (normal, recíproca-normal o log-normal) para los tiempos invertidos por las células en cada una de las fases. Utilizando estas distribuciones el programa permite generar curvas FLM teóricas que se comparan con FLM experimentales, obtenidas en tumores mamarios de rata transplantados. Concluye que la distribución log-normal para la duración de los intervalos es la que proporciona un mayor ajuste entre la FLM teórica y la real.

En la misma línea están los trabajos de Bronk (1969) y de Brockwell, Trucco y Fry (1972). El primero admite una distribución normal de la

duración de las fases y el segundo una distribución gamma. Los autores de este último afirman que "no existe una razón a priori para preferir una u otra (la distribución log-normal preferida por Barrett o la gamma)", esto define bastante bien esta línea de modelos que a pesar de su elaborado desarrollo matemático no contienen un concepto teórico de la cinética del ciclo celular que permita predecir qué tipo de distribución debería ser más adecuado. La teoría de estos modelos se limita, por tanto a la generación de curvas FLM a partir de distintas suposiciones de distribución estadística de la duración de las fases del ciclo y la selección de la mejor distribución se realiza a posteriori, comparando la FLM calculada con la real.

Según el modelo propuesto por Takahashi en 1966, y en 1968 en una forma más generalizada, el ciclo celular se divide en subfases. La célula debe pasar por todas las subfases ordenadamente una tras otra. Una determinada serie de subfases constituye cada uno de los intervalos fundamentales. El tiempo que una célula permanece en cada compartimento o subfase se distribuye exponencialmente, dicho de otra manera, la transición de una subfase a la siguiente se caracteriza por una probabilidad de transición constante; de esto se sigue que la distribución de probabilidad de densidad celular en un intervalo o en todo el ciclo debe ser de tipo gamma. La distribución tipo gamma es una distribución sesgada a la derecha que se extiende en función de la constante de transición y del número de compartimentos de la fase. A partir de la cinética de transición exponencial se establece un sistema de ecuaciones diferenciales simultáneas que describe la cinética de los compartimentos del ciclo :

$$\frac{d N_1(t)}{d t} = 2 \lambda_K \cdot N_K(t) - (\lambda_1 + \mu_1) \cdot N_1(t) \quad (20)$$

$$\frac{d N_i(t)}{d t} = \lambda_{i-1} \cdot N_{i-1}(t) - (\lambda_i + \mu_i) \cdot N_i(t) \quad (21)$$

$$i = 2, 3, \dots, K$$

Donde N es el número de células de una determinada subfase, λ es la constante de velocidad para la transición de una subfase a la siguiente y μ es la constante de mortalidad celular. Las constantes λ y μ pueden ser iguales para todas las subfases o no (modelo generalizado). El ciclo se compone de k subfases. La ecuación (20) describe la cinética del primer compartimento del ciclo ($i = 1$) y la (21) la de cualquier otro compartimento; en ambos el segundo miembro se compone de dos términos: El de nacimiento o entrada al compartimento y el de desaparición del compartimento por muerte o por transición al compartimento siguiente. En la ecuación (20) el primer término lleva el factor 2 para dar cuenta que en el último compartimento del ciclo (k) cada célula se divide produciendo dos que entran en el primer compartimento. A partir de este sistema y con ayuda de un computador digital puede calcularse el número de células en cada subfase en función del tiempo y la FLM correspondiente.

Desarrollado independientemente pero basado en la misma cinética multicompartmental de Takahashi, el trabajo de Jansson (1972) tiene en cuenta la variación de los parámetros del ciclo a lo largo del crecimiento de una población celular cancerosa o en respuesta al tratamiento, lo cual le confiere un gran interés. Discute Jansson la relación entre la duración media de un intervalo (m) y el número de subfases que lo componen (n) y la constante de transición o de flujo (λ): $m(n, \lambda)$. Este punto es muy importante, ya que el mecanismo de regulación del ciclo celular, es decir, el mecanismo de extensión o contracción de sus intervalos, no solamente importa en relación a la comprensión de los cambios cinéticos durante el crecimiento de la población o a consecuencia de tratamientos, sino que además da información sobre la "estructura" del ciclo. La duración media de un intervalo (m) depende del número de compartimentos o subfases que lo constituyen y de la constante de transición entre ellos (λ). Jansson compara la duración de los intervalos fundamentales (G_1 , S , G_2 , y M) y considera dos alternativas para explicar las diferencias de la duración media:

- a) λ invariante (igual para todos los intervalos) y n variable
- b) λ variable y n invariante .

Según la alternativa (a) la duración de los intervalos será una función lineal del número de compartimentos siendo λ la constante de proporcionalidad. Los puntos (m, n) de los cuatro intervalos fundamentales estarán en una recta de pendiente λ . Según la alternativa (b) las diferencias de duración de los intervalos dependen del valor de la constante de transición (λ) característica de cada uno de ellos. Los puntos (m, n) de los intervalos quedarán situados en una recta paralela al eje m , ya que el valor de n es igual para todos. Las dos alternativas fueron comparadas mediante 80 curvas FLM experimentales de diversa procedencia, para las cuales se determinaron, de acuerdo con el modelo, los valores m y n , independientemente para cada intervalo. Si se calcula para cada intervalo las medias de estos 80 valores m, n y se representan en un sistema de coordenadas se observa que los puntos correspondientes a G2, S y M están en una recta que pasa por el origen y que indica una proporcionalidad directa entre m y n , es decir de acuerdo con la alternativa (a). Por el contrario, el punto correspondiente a G1 no pertenece a esta recta pero forma con el punto G2 una recta paralela al eje m , por tanto de acuerdo con la alternativa (b). Concluye Jansson que la hipótesis de velocidad de flujo constante (constante de transición igual para todos los intervalos) es válida cuando se comparan entre sí S, G2 y M y que la hipótesis de velocidad de flujo variable (constante de transición distinta) está de acuerdo con la relación entre G1 y G2. De otra manera, el flujo a través de los intervalos S, G2 y M sería uniforme y el tiempo invertido por la célula en cada parte dependería del número de pasos u operaciones que debe realizar para completarla. El paso a través de G1 se realizaría con una velocidad de flujo distinta, la diferencia de duración entre G1 y G2 no dependería de un distinto número de pasos sino de sus diferentes constantes de transición. De todo ello deriva Jansson una nueva concepción del ciclo que coincide con la que estudiaremos más adelante bajo el nombre de " modelo del G0 o de probabilidad de transición " : El ciclo se divide en dos fases, la fase reproductiva constituida por parte de G1, S, G2 y M con la misma velocidad de flujo en toda su longitud y la fase productiva o G0, que co-

responde a la parte restante del G1 clásico y que posee una velocidad de flujo distinta de la de la fase reproductiva.

También en la línea de Takahashi y Jansson están los trabajos de Lee (1977), Hahn (1966 y 1970) y Thames y White (1977). Estos dos últimos proponen modelos de vector de estado, según los cuales el ciclo celular se divide en estados discretos (equivalentes a las subfases o compartimientos de los modelos anteriores) que reflejan la edad biológica de las células. A cada nivel de madurez le corresponde una posición en el vector de estado y el número de células de la población de un determinado nivel de edad es el valor del elemento asociado a la posición correspondiente en el vector. Para un tiempo t existe un vector $X(t)$ que es una descripción de la distribución de edad biológica de las células. El vector de estado representa la forma discontinua de una distribución de probabilidad de densidad; esta es la diferencia más importante en relación a los otros trabajos que a pesar de ser modelos multicompartimentales utilizan distribuciones de probabilidad continuas. El avance a través de los estados de madurez se define, también aquí, por probabilidades de transición.

2.3.3 El modelo del G0 o de probabilidad de transición : hipótesis y parámetros, curvas alfa y beta

Según hemos mencionado anteriormente, el segundo grupo de trabajos sobre modelos estocásticos del ciclo celular está centrado en el modelo del G0 o de probabilidad de transición. Aunque resulta evidente que este modelo es un caso particular de los de Takahashi y Jansson, en toda la literatura relativa al mismo no hemos podido encontrar ninguna referencia a los trabajos de estos últimos. Todo parece indicar que se ha llegado independientemente y por caminos algo distintos a un esquema conceptual muy semejante.

La primera descripción del modelo propiamente dicho se debe a Burns y Tannock en 1970, aunque en el trabajo de Cattaneo, Quastler y Sherman de 1961 se formula por primera vez la hipótesis de la existencia de una transición estocástica de probabilidad constante en el intervalo G1 que

determina la iniciación de la síntesis de DNA. Esta hipótesis se formula en relación a la interpretación de la gráfica FLM obtenida en la población celular proliferante del folículo piloso del ratón. A partir de la forma de la segunda onda de la curva es posible realizar una estimación aproximada de la distribución de probabilidad de la duración del intervalo G1 (Quastler y Sherman 1959). Los autores afirman que los datos de la FLM en el folículo piloso son compatibles con una distribución exponencial del intervalo G1, lo cual les lleva a la hipótesis de la transición de probabilidad constante. Creemos que el trabajo de Cattaneo Quastler y Sherman (1961) tiene una gran importancia en el desarrollo de los modelos estocásticos del ciclo celular, por varias razones: es el primero de todos los que hemos revisado, fue publicado en una revista de gran difusión (Nature) y dos de sus autores (Quastler y Sherman) eran muy conocidos por sus estudios sobre la interpretación de la FLM. Todo ello nos hace suponer que este trabajo debió ser conocido por la mayoría de autores ocupados en ciclo celular. Así es, en el caso de Smith y Martin que en su completa revisión del modelo en 1974 reconocen que en dicho trabajo se explica por primera vez la variabilidad del intervalo G1 mediante el concepto de probabilidad de transición.

La formulación completa del modelo es debida a Burns y Tannock (1970) y a Smith y Martin (1973) y (1974). Los dos primeros se basaron en gráficas FLM y en especial en la FLM obtenida en carrillo de hamster, mientras que Smith y Martin, como la mayoría de trabajos relativos al modelo que iremos mencionando, lo hicieron en distribuciones de frecuencia de edad celular obtenidas por medición individual de GT en cultivos celulares utilizando la técnica de fotografías a intervalos ("time-lapse"). Unos y otros desarrollan un esquema conceptual idéntico pero emplean una nomenclatura distinta, nosotros utilizaremos la de Smith y Martin.

De acuerdo con el modelo, el ciclo celular se halla constituido por dos partes esencialmente distintas desde un punto de vista cinético (figura 11). Los intervalos S, G2, M y seguramente una parte del intervalo G1, englobados bajo el nombre de "fase B" del ciclo, representan el programa de reproducción propiamente dicho compuesto por una serie de etapas

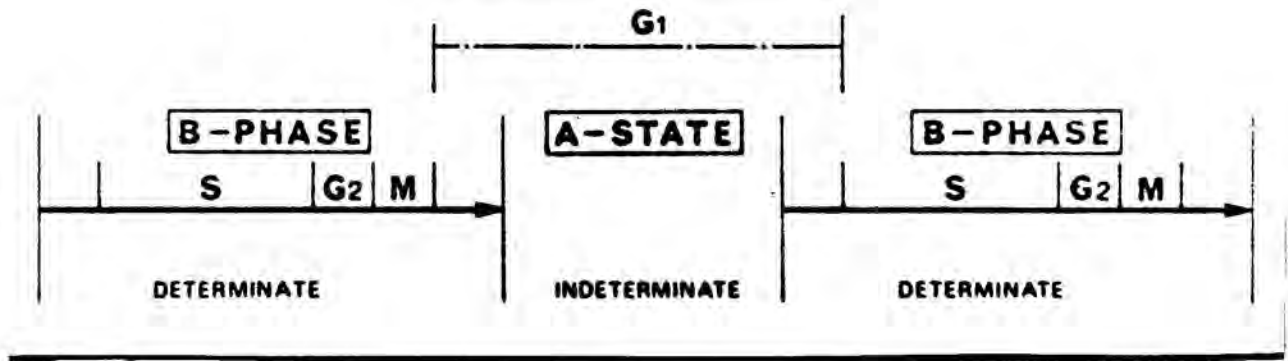


Figura 11 : Esquema del modelo de probabilidad de transición según Smith y Martin (1973).

que la célula realiza una tras otra de un modo completamente determinístico, por ello la duración de la fase B se supone constante o con un pequeño margen de variabilidad de distribución normal. A la parte restante del ciclo, que corresponde a G1 se la denomina "estado A". El estado A es equivalente a lo que en la nomenclatura de otros autores (Lajtha 1963, Burns y Tannock 1970) se llama G0. A esta parte del ciclo se la llama estado y no fase porque en el mismo la célula no está realmente avanzando en su programa reproductor sino detenida fuera del mismo. Una célula permanecerá en dicho estado por un tiempo indeterminado, pero para cada tipo celular y condiciones de cultivo, la transición del estado A a la fase B se realiza a una frecuencia constante, o lo que es lo mismo, la célula tiene una probabilidad definida de realizar la transición en una unidad de tiempo. Semajantemente aunque la duración total del ciclo (GT) es indeterminada para una célula en particular a priori, el GT medio de la población, en condiciones definidas de cultivo tiene un valor característico que es función de la duración de la fase B (TB) y de la constante de velocidad para la transición. Se trata de una situación formalmente idéntica a la desintegración de un isótopo radioactivo, es decir una

cinética de primer orden.

$$N_A(t) = N_A(0) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (22)$$

Donde $N_A(0)$ es el número inicial de células en el estado A, $N_A(t)$ es el número de células en el estado A después de un incremento de tiempo t y k es la constante de velocidad para la transición.

El modelo predice no solamente una gran variabilidad del intervalo G_1 y, por tanto, de la duración total del ciclo debida a la transición al azar, sino la distribución exponencial de esta variabilidad. Smith y Martin (1973, 1974) hallan el soporte experimental del modelo en las distribuciones de frecuencia de duración del ciclo celular determinadas por distintos autores en varios tipos celulares a partir de mediciones individuales de GF mediante fotografías a intervalos. Los datos se representan como proporción de células de la población que permanecen sin dividir en función del tiempo o edad celular: alfa (t). De acuerdo con el modelo, el valor de alfa será igual a la unidad durante un tiempo igual a T_B , que corresponde a la duración de la fase determinística igual para todas las células; a partir de este momento alfa disminuirá exponencialmente.

$$t > T_B \quad \alpha = \frac{N_A(t)}{N_A(0)} = e^{-k \cdot t} \quad (23)$$

Donde los símbolos tienen el mismo significado que en la ecuación (22). En la figura 12 tomada de Smith y Martin (1973) se representan curvas alfa construidas a partir de distintos trabajos. En estas gráficas se representa el logaritmo de alfa (t) con lo que la función exponencial se convierte en lineal. Si se toman logaritmos naturales, la pendiente de la recta es igual a la constante de velocidad para la transición (k).

$$t > T_B \quad \ln \alpha = -k \cdot t \quad (24)$$

En las cinco gráficas de la figura 12 puede comprobarse el decaimiento exponencial que empieza a diferentes tiempos, correspondientes a la distinta duración de la fase B en cada tipo de célula y / o condiciones de cul-

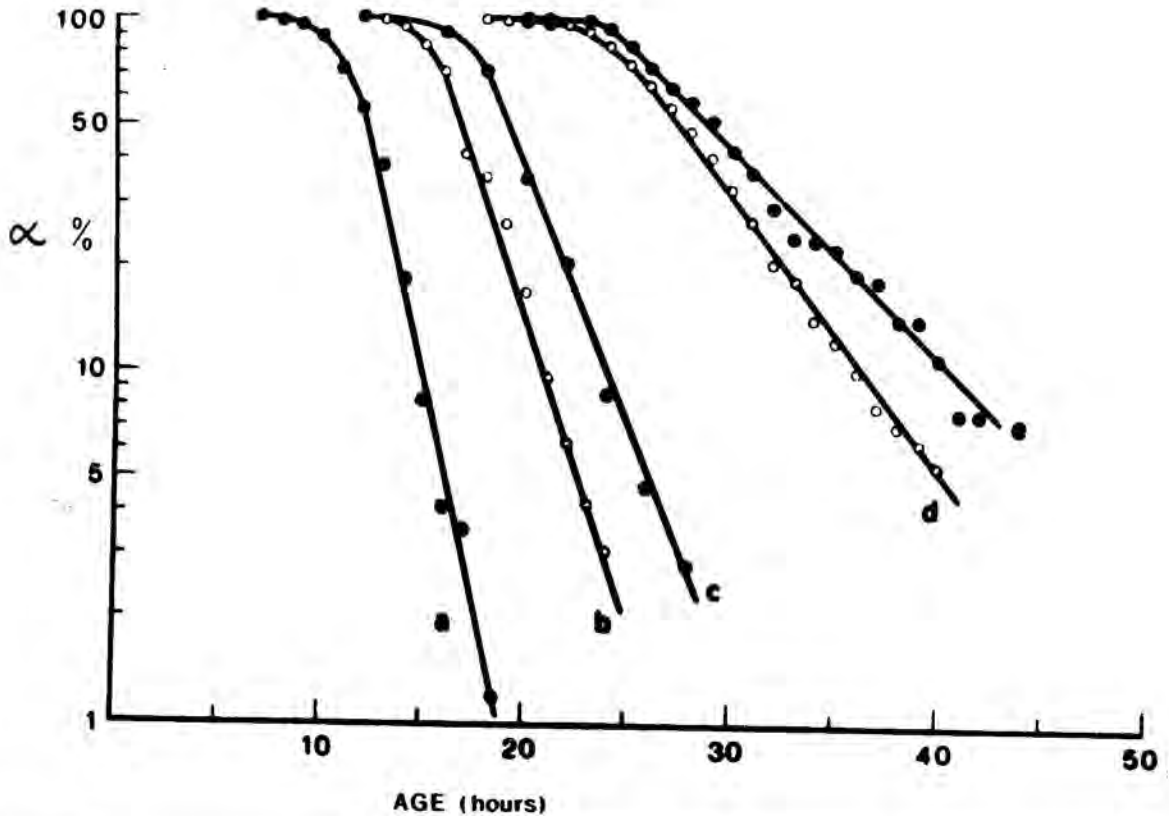


Figura 12 : Curvas alfa correspondientes a distintos tipos celulares en cultivo; a) sarcoma de rata, b) HeLa S3, c) fibroblastos de ratón d) L5, e) HeLa. (Tomado de Smith y Martin 1973).

tivo. Así mismo se pueden observar diferencias en las pendientes que indican distintas constantes de velocidad para la transición. El hecho de que el decaimiento exponencial no se inicie bruscamente a partir de TB, sino que lo haga mediante una incurvación suave hasta alcanzar la pendiente k es debido a una pequeña variabilidad en la duración de la fase B. Aunque el ciclo celular de cada población queda completamente definido mediante dos parámetros, la duración de la fase

B (TB) y la constante de transición del estado A a la fase B (k). Smith y Martin introducen el de "probabilidad de transición" (p), que da nombre al modelo y tiene un significado semejante al de la constante de velocidad pero de carácter más intuitivo. La probabilidad de que una célula realice la transición puede medirse como la proporción de células que salen del estado A en la unidad de tiempo.

$$p = \frac{N_A(0) - N_A(t)}{N_A(0) \cdot t} = \frac{1 - N_A(t) / N_A(0)}{t} \quad (25)$$

Despejando $N_A(t)/N_A(0)$ de la ecuación (22), substituyendo en (25) y tomando el tiempo igual a la unidad, tenemos la relación entre la probabilidad de transición y la constante de velocidad para la transición.

$$p = 1 - e^{-k} \quad (26)$$

Ambas constantes (p y k) tienen la dimensión de una frecuencia, es decir, inversa del tiempo. La probabilidad de transición, como toda probabilidad tiene sus límites en cero y uno, mientras que la constante de velocidad oscila entre cero e infinito.

Además de las curvas alfa, las mediciones individuales de GT permiten construir otro tipo de representación, denominado curva beta, que constituye un apoyo experimental de importancia decisiva para el modelo de probabilidad de transición (Figura 13). Así como las curvas alfa son una medida de la variabilidad de la duración del ciclo para una población celular, las curvas beta lo son de la variabilidad del mismo parámetro entre pares de células hermanas, es decir, células que proceden de una misma división. Beta (t) es la proporción de pares de células hermanas cuyos ciclos difieren en un tiempo mayor que t; por ejemplo, si beta(t) es 0,6 para t=1hora, esto significa que la duración del ciclo en el 60% de pares de células hermanas difiere en más de una hora y en el 40% en menos de una hora. El modelo de probabilidad de transición predice que las curvas beta deben ser exponenciales y que si se representan como logaritmo natural de beta adoptarán la for-

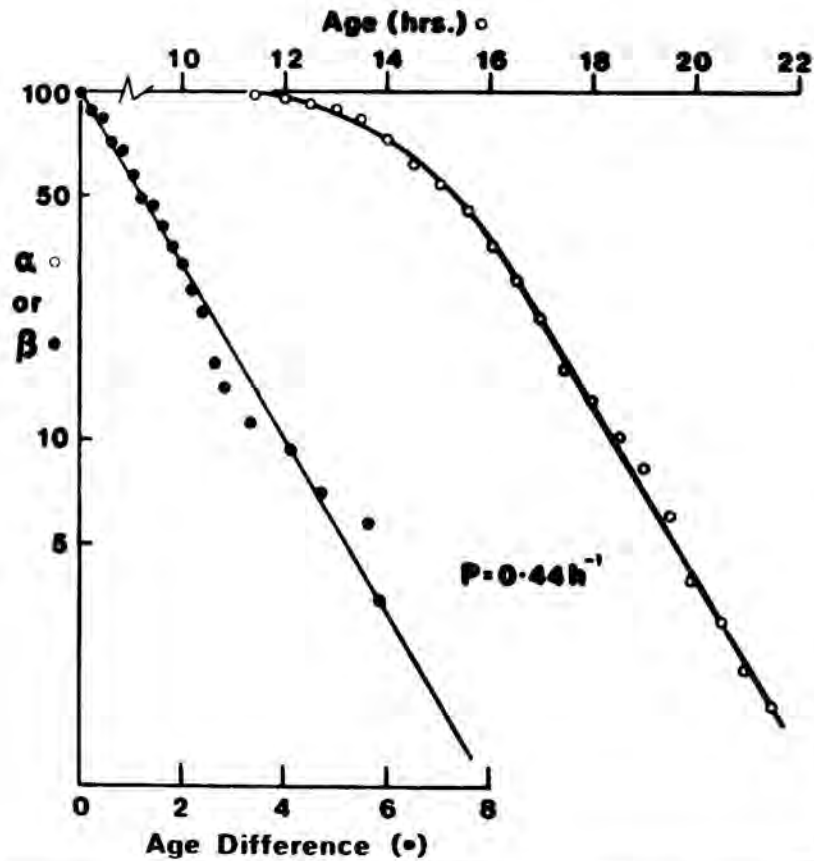


Figura 13 : Curvas alfa y beta de un cultivo de Euglena gracilis. Observar que ambas gráficas poseen un decaimiento exponencial de la misma pendiente. (Tomado de Smith y Martín 1974).

ma de una recta de pendiente igual a la constante de velocidad para la transición, lo mismo que la forma logarítmica de la curva alfa correspondiente. Aunque existe una correlación entre los GT de células hermanas más estrecha que entre pares cualesquiera de células, esta correlación es siempre imperfecta (Minor y Smith 1974). Si las células son capaces de dividirse con precisión, deberíamos esperar que las células hermanas fueran genética y bioquímicamente idénticas, y, por tanto, tener un ciclo celular de la misma duración. Según el modelo de probabilidad

de transición, esta identidad podría admitirse para la fase B, lo cual explicaría la mayor correlación de GT entre hermanas que entre pares celulares sin relación pero carecería de sentido el aplicarla a la duración del estado A. La hipótesis fundamental del modelo consiste precisamente en asumir que toda célula producida en una división, antes de comprometerse en un nuevo ciclo reproductivo, permanecerá por un tiempo indeterminado en un estado "fuera de ciclo". La cinética de primer orden para la transición de dicho estado a la fase B dará razón de la variabilidad de GT imputable a esta parte del ciclo, que será la misma para cualquier par de células de la población, independientemente de si son o no hermanas, y cuya distribución dependerá únicamente de la constante de velocidad para la transición. Esta predicción del modelo ha sido confirmada por las curvas beta experimentales (Minor y Smith 1974, Smith y Martin 1974 y Shields 1977 y 1978).

2.3.4 Interpretación de la FLM por el modelo de probabilidad de transición; determinación de la constante de velocidad en función de la constante de proliferación y la duración de la fase B

Hemos visto hasta ahora como las curvas alfa y beta constituyen el soporte experimental directo del modelo y como pueden determinarse fácilmente a partir de las mismas los parámetros cinéticos del ciclo: La constante de velocidad y la probabilidad de transición determinables a partir de la pendiente de ambos tipos de curvas y la duración de la fase B medida en las curvas alfa como el tiempo durante el cual la proporción de células no divididas se mantiene igual al 100%. Sin embargo, dichos parámetros pueden también calcularse a partir de otro tipo de datos como la constante de proliferación (PK) y la gráfica de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM). Según el modelo de probabilidad de transición, la constante de velocidad para la transición (k) y la duración de la fase B (TB) determinan completamente el valor de la constante de proliferación, de modo, que ha de ser posible hallar una relación matemática que permita calcular la constante de transición a partir de la constante de proliferación y de la duración de la fase B. La cons-

tante de proliferación puede obtenerse de forma muy simple a partir de los índices o frecuencias de fase (índice mitótico o índice S), si se conoce la duración de la fase correspondiente, o mediante el método del bloqueo mitótico. A partir de la FLM podrán medirse MT y ST necesarios para el cálculo de PK y, además, la duración de la fase B (TB), pero para esto último la gráfica debe ser reinterpretada de acuerdo con la teoría del modelo de probabilidad de transición :

Lo que podríamos llamar interpretación "clásica" de la curva FLM, el método de lectura del nivel 0,5 de Q uastler y Sherman por ejemplo, resultó una primera aproximación al problema planteado por la "imperfección" de las FLM reales, es decir, por el amortiguamiento progresivo de las ondas de la curva que se hace ya ostensible en la segunda, la cual, en algunos casos, llega a desaparecer por completo. El amortiguamiento de la FLM es debido a la desincronización del grupo de células que en el momento de la pulsación con timidina H-3 estaban agrupadas dentro de los límites del intervalo S. Esta "nube celular" relativamente compacta al principio se va dispersando en unos pocos ciclos, de manera análoga a la pérdida de sincronía de una población natural o artificialmente sincronizada, que hemos descrito anteriormente. Para el modelo de probabilidad de transición y, en general, para otros modelos estadísticos este fenómeno es fácilmente explicable, pues es una consecuencia necesaria de la transición al azar asumida. La interpretación de la primera onda, a partir de la cual pueden medirse G2T, MT y ST, según el modelo de probabilidad de transición, es esencialmente igual a la interpretación clásica, pero no es así en el caso de la segunda onda.

La lectura clásica de la FLM admite que la distancia entre el primer y segundo máximos o entre el inicio de la primera y segunda ondas equivale a la duración media del ciclo celular, en cambio, según el modelo de probabilidad de transición equivaldría a la duración mínima del ciclo, o sea, a la de la fase B (TB). En efecto, cuando la nube celular marcada haya traspasado la primera mitosis después de la pulsación dando lugar a la primera onda, entrará en el estado A del que las células saldrán al

azar según una cinética exponencial para pasar a la fase B, algunas células habrán permanecido un tiempo inapreciable en el estado A, otras más tiempo y otras más y más en proporciones definidas por la probabilidad de transición. La cinética exponencial de la transición se reflejará en la llegada de la nube de células marcadas a la mitosis. Si consideramos la nube celular constituida por pequeños grupos ordenados secuencialmente según su posición en el intervalo S en el momento de la pulsación, los diferentes grupos irán llegando a la mitosis en el orden correspondiente, pero cada grupo lo hará con una cinética exponencial determinando solapamientos entre los grupos. La forma del segundo pico estará determinada por la suma escalonada de exponenciales correspondientes a los diferentes grupos. En la tabla 4 y en la figura 14 presentamos una simulación numérica de la segunda onda de la FLM realizada por nosotros según el modelo de probabilidad de transición. El inicio del segundo pico representa la llegada a la mitosis de las células más rápidas del primer grupo, es decir, las que han permanecido menos tiempo en el estado A; mientras vayan entrando las células más lentas del primer grupo habrán empezado a entrar ya las más rápidas del segundo o aún, las del tercero. El máximo de la segunda onda de la FLM corresponderá al tiempo en que haga su entrada el último grupo de células es decir, las que iniciaban la síntesis de DNA en el momento de la pulsación; hasta este momento han entrado las "cabezas" de los diferentes grupos, que debido a la estructura exponencial de los mismos contienen la mayoría de células, a partir de este punto, la segunda onda dependerá de la entrada escalonada de las "colas" de los grupos celulares y el sumatorio de mitosis marcadas disminuirá progresivamente. Concluyendo, el inicio de la segunda onda viene determinado por la llegada a la mitosis de la "cabeza" del primer grupo y el máximo por la llegada de la "cabeza" del último, la distancia entre ambos puntos mide la duración del intervalo S y su posición temporal es independiente de la probabilidad de transición. Esta última, en cambio, afecta a la altura del máximo y a la dispersión de la "cola" de la onda. Puesto que el inicio y el máximo de la segunda onda vienen determinados

TABLA 4

Simulación numérica de la contribución a la mitosis de diferentes grupos celulares que componen la "nube celular" marcada en una FLM (2ª onda)

La simulación numérica se ha realizado para una población celular de rata (cripta yeyunal, parte superior), cuyos datos cinéticos se obtuvieron de Cameron 1971 : G1T (1,5 h), ST (6 h), G2T (1,5 h), MT (1 h), GT (10 h).

A partir de los anteriores valores hemos calculado : PK ($0,0693 \text{ h}^{-1}$), TB (8,5 h), k ($0,623 \text{ h}^{-1}$), T1/2 (1 h), p ($0,464 \text{ h}^{-1}$).

Hemos subdividido el intervalo S en 6 grupos (I - VI) de células cada uno de los cuales ocupa una hora en la nube celular marcada en el momento de la pulsación. Suponemos que cada grupo se compone de 1000 células. La densidad del ciclo en la mitosis es de 1000 células/hora. Hemos despreciado números de células inferiores a 15.

En la figura 14 se representa gráficamente la simulación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Horas
I	500	250	125	62	30	15	0	0	0	0	0	
II	0	500	250	125	62	30	15	0	0	0	0	
III	0	0	500	250	125	62	30	15	0	0	0	
IV	0	0	0	500	250	125	62	30	15	0	0	
V	0	0	0	0	500	250	125	62	30	15	0	
VI	0	0	0	0	0	500	250	125	62	30	15	
SUMA	500	750	875	937	967	982	482	232	107	45	15	

por las "cabezas" del primero y último grupos de células marcadas, sus distancias respecto a los puntos homólogos de la primera onda mal pueden medir la duración media del ciclo; lo que miden realmente es la duración mínima que lógicamente equivale a la de la fase determinística del mismo (TB). Esta reinterpretación de la FLM permite comprender las discrepancias entre los valores de GT medidos a partir de la FLM y a partir de los índices de fase;

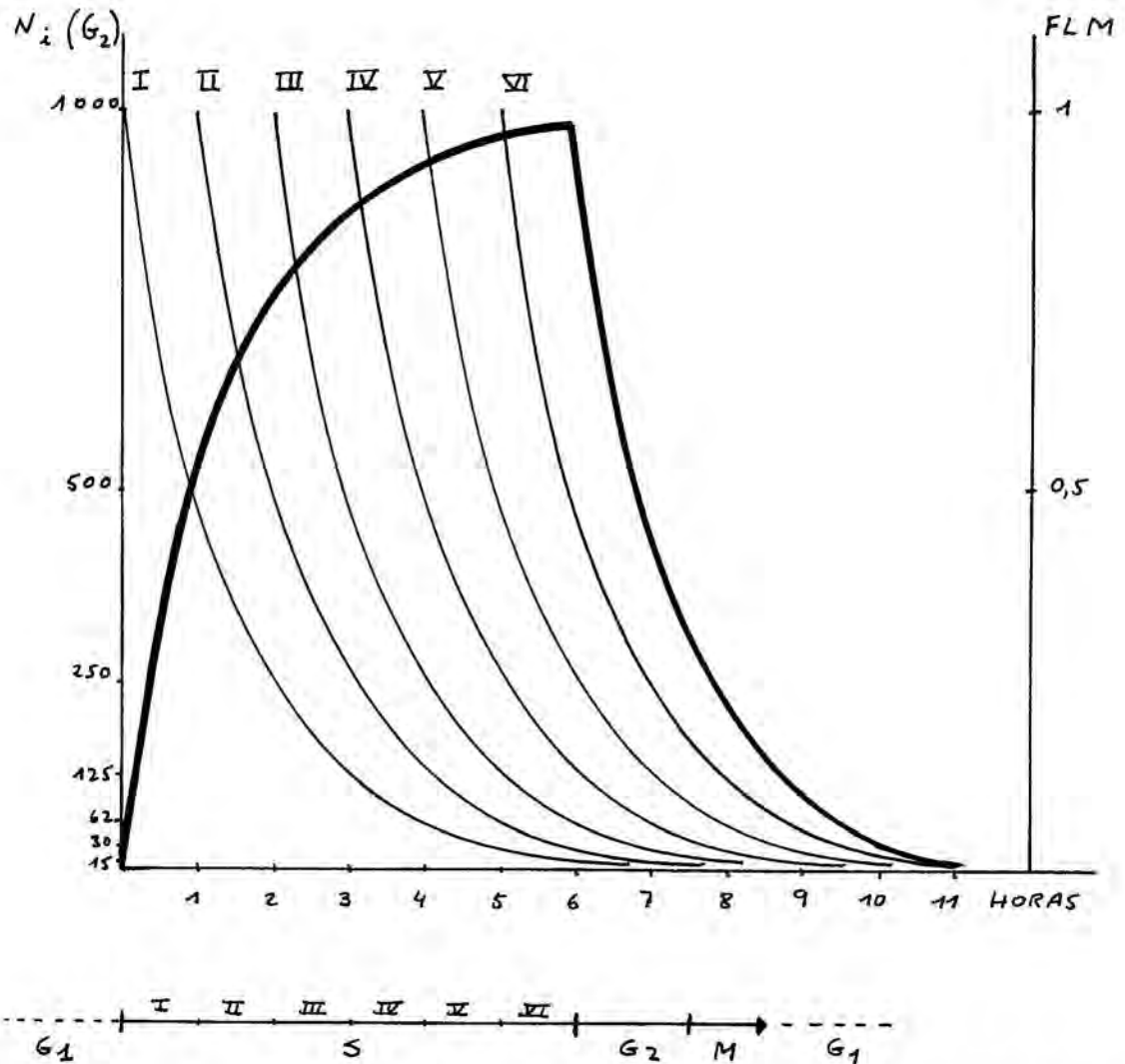


Figura 14 : Simulación numérica de la contribución a la mitosis de diferentes grupos celulares que componen la "nube celular" marcada en una FLM (2ª onda). Las gráficas en trazado fino describen la cinética de desaparición de células del intervalo G2 correspondiente a cada grupo : $N_i(G_2)$. La gráfica en trazado grueso es el sumatorio de células correspondientes a los diferentes grupos que se encuentran en la mitosis en diferentes tiempos (FLM). Ver datos numéricos en la tabla 4 y comentarios en el texto.

obteniéndose en este último caso valores de GT casi siempre más largos. ya que los índices de fase son números globales que dependen de toda la

población, deben proporcionar necesariamente GT medios. Esta discrepancia había sido interpretada anteriormente admitiendo que las poblaciones eran inhomogéneas cinéticamente: una fracción de la población se reproducía, la fracción de crecimiento o de proliferación, mientras que la otra parte no lo hacía, permaneciendo en estado G_0 . Sin excluir la posibilidad de que en algunos casos pueda darse esta inhomogeneidad, el modelo de probabilidad de transición hace innecesario el admitirla en todos los casos. En las medidas globales de los índices de fase, los GT largos de las células lentas que constituyen la cola de la FLM (2ª onda) promedian con los GT cortos de las células más rápidas que forman la parte ascendente de la segunda onda. Ya que únicamente esta última es tenida en cuenta en la lectura clásica de la FLM la discrepancia entre el GT medido por ambos métodos queda explicada.

Una vez vista la forma de determinar T_B a partir de la curva FLM, deduciremos la relación que nos permitirá calcular la constante de velocidad para la transición (k) y la probabilidad de transición (p) a partir de la constante de proliferación (PK) y de la duración de la fase B (T_B).

Partiendo del crecimiento exponencial de la población

$$N(t) = N(0) \cdot e^{PK \cdot t} \quad (27)$$

el crecimiento de N de 0 a t es

$$N(t) - N(0) = N(0) \cdot e^{PK \cdot t} - N(0) \quad (28)$$

En un momento determinado una fracción de la población igual a N_A/N se halla en el estado A y para PK constante N_A/N también lo es y el incremento de N_A de 0 a t puede escribirse como

$$N_A(t) - N_A(0) = N_A(0) \cdot e^{PK \cdot t} - N_A(0) \quad (29)$$

Para el cálculo de la constante de velocidad (k) y la probabilidad de transición (p) hace falta poner N_A/N en función de PK y de T_B :

Si consideramos un intervalo de tiempo igual a la duración de la fase B, las células que se dividen durante dicho intervalo estaban en algún punto

de la fase B al comienzo del mismo ($t = 0$), por tanto

$$N(t) - N(0) = N_B(0) = N(0) \cdot e^{PK \cdot T_B} - N(0) \quad (30)$$

y en general

$$N_B = N \cdot e^{PK \cdot T_B} - N \quad (31)$$

Por definición

$$N_A + N_B = N$$

que utilizando la expresión anterior (31) para N_B se convierte en

$$N_A + N \cdot e^{PK \cdot T_B} - N = N \quad (32)$$

dividiendo por N y trasponiendo términos obtenemos

$$\frac{N_A}{N} = 2 - e^{PK \cdot T_B} \quad (33)$$

Esta ecuación (33) es de gran interés para la comprensión del modelo: Es fácil ver que cuando la constante de proliferación (PK) tiende a 0 la relación N_A/N tiende a la unidad, o lo que es lo mismo, la totalidad de las células de la población permanece en el estado A o G0. Al contrario, si el término exponencial del producto $PK \cdot T_B$ tiende a 2, el cociente N_A/N tiende a 0, lo cual significa que las células no permanecen detenidas en el estado A sino que se encuentran en su totalidad en el programa de reproducción o fase B.

La velocidad de producción de células en el tiempo t ha de ser igual al flujo del estado A a la fase B en el tiempo $t - T_B$:

$$PK \cdot N(t) = k \cdot N_A(t - T_B) \quad (34)$$

donde k es la constante de velocidad para la transición.

$N(t)$ puede escribirse como:

$$N(t) = N(t - T_B) \cdot e^{PK \cdot T_B} \quad (35)$$

y $N_A(t - T_B)$ puede obtenerse a partir de la ecuación (33)

$$N_A(t - T_B) = 2 \cdot N(t - T_B) - N(t - T_B) \cdot e^{PK \cdot T_B} \quad (36)$$

Substituyendo las expresiones (35) y (36) en la (34)

$$PK \cdot N(t - T_B) \cdot e^{PK \cdot T_B} = k \cdot [2N(t - T_B) - N(t - T_B) \cdot e^{PK \cdot T_B}] \quad (37)$$

dividiendo ambos miembros por $N(t - T_B)$ y despejando k

$$k = \frac{PK \cdot e^{PK \cdot T_B}}{2 - e^{PK \cdot T_B}} \quad (38)$$

hemos obtenido la expresión que buscábamos. A partir de las expresiones (26) y (38) puede calcularse la probabilidad de transición a partir de PK y de T_B .

2.3.5 Discusión comparativa sobre el modelo de probabilidad de transición y otros modelos del ciclo celular

La diferencia fundamental entre el modelo de probabilidad de transición y los demás modelos estadísticos del ciclo celular radica en el grado de concreción de la fuente de variabilidad. Mientras que algunos modelos (Barrett 1966, por ejemplo) asumen simplemente una distribución de probabilidad de densidad para la duración de cada intervalo sin entrar en el mecanismo que genera esta distribución o la derivan de un gran número de transiciones, sin que ninguna de ellas sea considerada como fundamental, en el sentido de limitante de la frecuencia del ciclo (modelos multicompartimentales como el de Takahashi 1966, 1968), el modelo de probabilidad de transición explica la variabilidad de la duración del ciclo como consecuencia de una transición única con cinética de primer orden que se localizaría en alguna parte del intervalo G_1 . La mayoría de modelos que hemos revisado son tan generales y poco comprometidos que difícilmente se les puede criticar con datos experimentales pues tienen suficiente flexibilidad para amoldarse a las más diversas situaciones. En cambio, el modelo de Burns y Tannock (1970) y de Smith y Martin (1973), comprometido a una opción mucho más concreta, ha originado numerosas discusiones basadas en la consideración de datos experimentales. Abordaremos a continuación las siguientes cuestiones: Transición única, localización en el ciclo y fundamento material de la

misma. Ajuste de las curvas alfa y beta experimentales a las exponenciales teóricas. Artefactividad debida a las condiciones experimentales in vitro.

La hipótesis de una transición única de probabilidad constante tiene su fundamento experimental en las curvas alfa y beta exponenciales, siendo en ambos casos el carácter exponencial una consecuencia necesaria de la hipótesis (Smith y Martin 1-973 y 1974), (Shields 1977 y 1978). Otro soporte experimental lo constituye la cinética de entrada de las células en el intervalo de síntesis de DNA que ha sido estudiada por Brooks (1975) en células BHK quiescentes estimuladas mediante adición de suero : después de un intervalo de unas ocho horas de añadir el suero al cultivo las células empiezan a sintetizar DNA. En presencia de adenosina la entrada de las células en el intervalo S sigue una cinética de primer orden cuya constante de velocidad depende directamente de la concentración de suero utilizada. Si no se añade adenosina la cinética no es de primer orden, ya que la constante de velocidad aumenta continuamente. Estos resultados han sido interpretados por Brooks suponiendo que la acción del suero sobre la probabilidad de transición es dependiente de la adenosina, cuya síntesis sería inducida, además por el suero. Si la purina es suministrada a la célula por el medio de cultivo, su capacidad de síntesis no es ya un factor limitante y el suero ejerce desde el primer momento su acción máxima para la concentración utilizada. Todo lo anterior está de acuerdo con el supuesto de Smith y Martin (1974) de que los cambios en la velocidad de reproducción producidos por el medio de cultivo dependerían primordialmente de modificaciones de la probabilidad de transición, sin que ello implique la invarianza absoluta de la duración de la fase B. Si las condiciones de cultivo son constantes las curvas alfa, beta, y la de entrada en el intervalo S (proporción de células no marcadas en función del tiempo, en presencia continuada de timidina (H-3) serán exponenciales según predice el modelo; al cambiar las condiciones de cultivo puede modificarse la probabilidad de transición y si la modificación no se realiza súbitamen-

te sino de forma gradual, la cinética no será de primer orden hasta que la probabilidad de transición no se estabilize en su nuevo valor.

En cuanto a la localización de la transición en el ciclo, lo primero que debe señalarse es que el intervalo G1 y el estado A no son la misma cosa. Quiere ello decir que parte del tiempo invertido por una célula en G1 correspondería a la fase B. La evidencia experimental que nos permite afirmar esto proviene de que en algún caso ha sido posible determinar la duración mínima del intervalo G1 mediante el estudio combinado en cultivos celulares de fotografías a intervalos e incubación con timidina H-3. En células amnióticas humanas Siskin y Morasca (1965) hallaron que ninguna célula incorporaba la timidina H-3 antes de cuatro horas después de la mitosis. Puesto que por definición el tiempo mínimo de permanencia en el estado A es 0, este resultado indica que, al menos en este tipo de células y posiblemente en otros, el estado A no abarca todo el G1 y la parte restante del G1 pertenecerá a la fase determinística del ciclo, que llamaremos G1B. Existen tres posibilidades para la localización del estado A en G1: Primera, G1B totalmente postmitótico seguido del estado A, con lo cual la transición se realizaría del estado A al intervalo S. Segunda, G1B totalmente pre-S, en este caso el estado A seguiría inmediatamente a la mitosis y la transición sería del estado A al G1B. Y tercera, G1B repartido en parte postmitótico y en parte pre-S, con el estado A entre ambos. Smith y Martin (1974) se decantan por la primera de las opciones basados en que la cinética de entrada al intervalo S de una población que acaba de ser liberada de un bloqueo por un inhibidor de la síntesis de DNA es exponencial, lo cual les lleva a admitir que las células estaban detenidas en el estado A situado inmediatamente antes de la iniciación del intervalo S. En contra de esta opinión el retraso observado siempre entre la estimulación de una población celular quiescente y la iniciación de la síntesis de DNA parece indicar un G1B pre-S. Sin embargo Smith y Martin consideran que el tiempo de este retraso no se invierte en el recorrido de un G1B pre-S sino que representa el tiempo necesario para que el estímulo modifique el estado de las células aumentando su probabilidad de transi-

ción. En todo caso, es probable que exista un componente G1B postmitótico ya que la reorganización del núcleo interfásico (desespiralización de los cromosomas y formación del nucleolo) parece necesario para la reanudación de la actividad del núcleo, sea en la forma de transcripción o de réplica del DNA.

Con respecto al fundamento material o bioquímico de la transición, Smith y Martin (1974) suponen que para la iniciación del intervalo S la célula debería adquirir un estado crítico, que podría venir determinado por una concentración umbral de un activador de la síntesis de DNA y que la concentración de dicho activador estaría sometida a fluctuaciones irregulares. La probabilidad de transición dependería de la distancia entre el umbral para la transición y la concentración media del activador; esta última podría aumentar por estímulos externos con lo cual lo haría a su vez la probabilidad de transición. La existencia de este tipo de activadores ha sido probada por los experimentos de fusión celular heterofásica (Rao y Johnson 1970) que comentamos en páginas anteriores pero su naturaleza química es desconocida, si bien no faltan candidatos (proteínas con afinidad para el DNA, calcio, cAMP, purinas, poliaminas, etc.) En cuanto a la existencia de fluctuaciones de concentración del activador no constituye una dificultad ya que cada día es mayor el número de evidencias, tanto teóricas como experimentales, de comportamiento oscilatorio en todos los niveles de organización biológica. En todo sistema, cuando el transporte de productos tiene lugar en la misma escala de tiempo que la velocidad de reacción química, los dos procesos pueden interaccionar produciendo oscilaciones. Oscilaciones temporales sostenidas han sido observadas en diversos sistemas de reacciones, siendo el ejemplo más conocido entre las biológicas, las reacciones glicolíticas (Othmer 1976 y Hess 1977). En el trabajo de Othmer se citan además otros sistemas oscilantes como los flujos iónicos mitocondriales, la concentración de cAMP en células miocárdicas, la síntesis de diversas enzimas etc.

Atendiendo al viejo principio de simplicidad conocido como "la na-

vaja de Occam" ("es vano hacer con más lo que puede ser hecho con menos") parecería fútil tomar en consideración modelos multicompartimentales más complejos como el de Takahashi (1966, 1968), habida cuenta de que el modelo de probabilidad de transición parece bien fundamentado y proporciona una imagen simple y clara del ciclo suficiente para explicar la cinética de la reproducción celular. Sin embargo, la comparación de los dos modelos ya iniciada anteriormente permite una comprensión más profunda de la mecánica del ciclo: el modelo de probabilidad de transición asume que el tiempo del ciclo celular se reparte entre un componente de duración constante, la fase B, y otro de duración indeterminada, el estado A. Los modelos multicompartimentales reparten totalmente el ciclo entre un encadenamiento de estados o compartimentos semejantes al estado A, es decir, no realizan la reserva de un tiempo mínimo de duración constante. Aunque a primera vista estos dos planteamientos parecen muy distintos, no lo son tanto ya que, tal como reconocen Smith y Martin, la fase B de su modelo podría en realidad estar constituida por una serie de estados con transiciones entre ellos de probabilidades próximas a la unidad. En este caso la fase B tendría una duración bastante constante, ya que la variabilidad de las distribuciones disminuye a medida que las probabilidades de transición aumentan. La pequeña variabilidad de la fase B, con un coeficiente de variación del orden de un 10%, que se supone responsable de la ligera desviación que hemos señalado de las curvas alfa experimentales con respecto a la teoría, podría explicarse de esta forma. A nuestro modo de ver, esta extensión de la concepción estadística a todo el ciclo es conveniente en relación al tratamiento teórico de la base molecular del programa de reproducción que no puede ser otra cosa que una sucesión irreversible de reacciones químicas, cambios físicos asociados y modificaciones supramoleculares de la estructura celular, todos ellos fenómenos de cinética esencialmente estadística. Cuando se trate de procesos en los que esté implicado un gran número de moléculas por célula, ésta se comportará como un sistema macroscópico, de conducta muy regular que no introducirá apenas variabilidad en la duración del ciclo. La situación será completamente distinta en los pasos del programa de reproducción en

los que el número de moléculas implicadas en el mismo sea muy bajo, entonces pequeñas diferencias entre células en el número absoluto de moléculas originarán una variabilidad intercelular de duración del proceso.

La formulación actual del modelo de probabilidad de transición nos parece una simplificación, muy útil a nuestro juicio, que consiste en englobar bajo el nombre de fase B el conjunto de pasos que por implicar seguramente un número de moléculas muy grande, las diferentes células de una misma población se desvían escasamente unas de otras en la progresión a través de la misma, de manera que, no constituye un error de importancia el considerar constante la duración suma de los diferentes pasos. Además el centrar la atención en una única transición, aquella que por su probabilidad relativamente baja condiciona la frecuencia del ciclo y permite su regulación es una guía para la identificación de los factores de mayor importancia en la regulación del ciclo, que deben ser aislados entre otros muchos de menor relevancia.

Resumiendo, podemos decir que el modelo de probabilidad de transición, en relación a la regulación de la frecuencia del ciclo celular, apunta hacia factores iniciadores de la síntesis de DNA que se presentan en concentraciones bajas y oscilantes, en un estado estacionario localizado en el tiempo del intervalo G1, la emergencia del cual dependería de una fluctuación por encima de un umbral determinado.

Según hemos visto el carácter exponencial de las curvas alfa y beta constituye el soporte más directo del modelo de probabilidad de transición. Es por ello, que la exponencialidad de las curvas alfa y beta experimentales es el punto decisivo donde se concentran las discusiones críticas sobre el modelo. Un primer aspecto es que en la mayoría de las curvas publicadas en apoyo del modelo, los valores de alfa y beta sólo se dan para proporciones de células relativamente altas y raramente alcanzan valores inferiores al 2%, lo cual según Wheals 1977, impide distinguir si los puntos experimentales se distribuyen realmente de forma exponencial o más bien log-normal o recíproca-normal. Otro tipo de crítica que ha sido hecha al modelo es el de la posible artefactividad

de los resultados como consecuencia de las condiciones experimentales : Así, por ejemplo, Shilo, Shilo y Simchen (1976) ha estudiado la cinética de formación de yemas en la levadura Saccharomyces cerevisae al liberar las células de un bloqueo en el punto de arranque del ciclo ("start"). El bloqueo se consigue mediante la hormona de apareamiento (factor alfa) o utilizando el mutante cdc25 a la temperatura no permisiva. Según los resultados obtenidos la cinética es de tipo exponencial, por lo que consideran válida la aplicación del modelo a esta levadura e identifican el punto de arranque como el de la transición estocástica. La validez de estas conclusiones ha sido puesta en duda por Nurse y Fantes (1977) y por Wheals (1977), que consideran no probado el que los puntos experimentales de las curvas alfa se ajusten mejor a una exponencial que a una distribución log-normal o recíproca-normal, dado que las curvas no alcanzan valores inferiores al 2% de células, Además, aducen que la cinética de entrada en el ciclo después de un bloqueo no es comparable con la del flujo a través del punto de arranque en una población que crezca normalmente y que la iniciación asincrónica del ciclo y su distribución exponencial serían imputables al proceso de recuperación después del bloqueo y no a la cinética de transición de "start". Wheals (1977) concluye que el trabajo de Shilo y cols. no permite decidir si el modelo de probabilidad de transición es más adecuado a la descripción del ciclo de Saccharomyces cerevisae que el del tamaño celular crítico. Este último admite que después de la división el programa de reproducción no se pondrá en marcha en tanto que las células no alcancen un determinado tamaño ; la iniciación del ciclo tendría lugar una vez alcanzado el tamaño celular crítico. En su trabajo de réplica a las anteriores consideraciones críticas, Shilo, Shilo y Simchen (1977) recogen nuevos datos experimentales con el objeto de superar las críticas realizadas a su trabajo de 1976. En primer lugar muestran que la cinética de entrada en el ciclo es independiente de las condiciones de bloqueo, es decir el medio utilizado para detener las células y el tiempo de permanencia en esta situación. Comunican también haber realizado un experimento en el que después de

sembrar en medio sólido un cultivo de células normales en crecimiento exponencial la proporción de células sin yemas disminuía exponencialmente con una constante de velocidad igual que en los experimentos de liberación del bloqueo y en la gráfica que presentan se observan valores inferiores al 2% de células que se ajustan bien a la exponencial. Todo lo anterior permite a los autores rechazar las críticas de Nurse y Fantes y de Wheals sobre la idoneidad del modelo de probabilidad de transición para explicar la cinética del ciclo de Saccharomyces cerevisiae. Además afirman que el modelo de probabilidad de transición y el del tamaño celular crítico no son mutuamente incompatibles, ya que en relación a este último, lo realmente demostrado es que la iniciación del ciclo requiere un tamaño celular mínimo, pero el que esto sea una condición necesaria no implica que sea suficiente. Según Shilo y cols. una vez la célula adquiere el tamaño celular crítico puede iniciar el ciclo, lo cual, sin embargo, no es una consecuencia inmediata sino que dependería de un suceso al azar de probabilidad constante.

En relación a los estudios realizados con líneas celulares de mamífero establecidas in vitro, podría aducirse que la distribución exponencial de ciclo celulares es un artefacto consecuencia de una heterogeneidad clonal y/o cariotípica de los cultivos utilizados. Shields (1977) sale al paso de esta dificultad mediante la presentación de curvas alfa y beta exponenciales obtenidas a partir de cultivos monoclonales de fibroblastos de ratón (línea establecida 3T3), con lo que descarta la heterogeneidad clonal y de cultivos primarios de fibroblastos de pollo y ratón (presumiblemente isogénicos y diploides) descartando la posibilidad de heterogeneidad cariotípica.

Finalmente podría argumentarse que la cinética exponencial observada es debida a la liberación de algún bloqueo desapercibido, impuesto por las condiciones de cultivo in vitro. Sin embargo, esto parece improbable ya que la distribución exponencial de duración de ciclos celulares ha sido comprobada en organismos unicelulares como Euglena y E. coli (Shields 1977) Además, las FLM obtenidas in vivo pueden ser deducidas con precisión a

partir de los presupuestos del modelo (De Maertelaer y Galand 1975 y 1977). Aunque, por razones técnicas, no es posible, en general, obtener mediciones individualizadas de GT in vivo en organismos pluricelulares, en algún caso especial, en que esto ha sido posible, se ha demostrado concordante con el modelo de probabilidad de transición. En efecto Signoret (1977) ha medido la duración individual de GT en los blastómeros de embrión de Axolote durante el onceavo ciclo de división y ha representado la correspondiente distribución de frecuencias de duración del ciclo celular. Se trata de una distribución sesgada a la derecha que puede deducirse teóricamente como el producto de convolución de una distribución normal y de una distribución exponencial. Esto es precisamente lo que cabe esperar del modelo de probabilidad de transición si se admite que la pequeña variabilidad de la duración de la fase B tiene una distribución normal, en este caso, la distribución de frecuencias de GC dependerá de la distribución exponencial correspondiente al estado A y de la distribución normal correspondiente a la fase B.

En la parte experimental de esta tesis exponemos el método de la "Coincidencia mitótica" ideado por nosotros para medir la variabilidad del ciclo celular entre células hermanas que permite construir curvas beta en organismos pluricelulares in vivo. y los resultados obtenidos al aplicar este método al parénquima hepático de embrión de pollo que concuerdan con el modelo de probabilidad de transición (Domingo et als. 1978).

2.4 El intervalo S

2.4.1 Generalidades

Según hemos mencionado en páginas anteriores, la reproducción de los cromosomas, basada en la réplica del DNA y en la síntesis e incorporación al cromosoma de los otros componentes del mismo, tiene lugar en un lapso de la interfase, denominado intervalo S, que, en general, queda separado de la división celular previa por un tiempo conocido como intervalo G1 y de la siguiente división por el llamado intervalo G2.

Cuatro son los aspectos que han sido mayormente estudiados en esta etapa del ciclo celular: En primer lugar, el problema de su desencadenamiento o iniciación. En segundo lugar, el sistema enzimático que interviene en la síntesis del DNA, que actualmente es bastante bien conocido para el caso de las bacterias, pero mucho menos en las células eucarióticas. El tercer aspecto es el del patrón de replicación cromosómica, sobre el que, gracias a la técnica de la autorradiografía (ARG) de cromosomas enteros y de fibras de cromatina extendidas obtenidos de células previamente pulsadas con timidina H-3, poseemos bastante información. Un último aspecto es el de la síntesis de histonas y de otras proteínas de la cromatina y su incorporación a los cromosomas nacientes durante la réplica del DNA, todo ello relacionado, naturalmente, con el problema de la conservación de la estructura cromosómica.

2.4.2 Iniciación del intervalo S y su posible relación con la membrana celular en las bacterias y con la envoltura nuclear en los eucariotas

Del problema del desencadenamiento o iniciación de la síntesis de DNA ya nos hemos ocupado, en parte, en relación al intervalo G1 y al modelo de probabilidad de transición. La conclusión principal que puede sacarse de los datos aportados es que la iniciación de la síntesis del DNA está probablemente sometida a un control intracelular positivo y que la "señal desencadenante" podría estar constituida por la elevación, por encima de un valor umbral, de la concentración de una o varias clases de moléculas

activadoras. Ya que en los experimentos de trasplante nuclear y de hibridación celular heterofásica se ha visto que la activación de la síntesis de DNA es operativa entre células pertenecientes no solamente a organismos de distinta especie sino incluso de distinta clase, cabe pensar que la naturaleza química de la señal activadora sea de baja especificidad biológica, probablemente una molécula de bajo peso molecular (Mitchison 1971). Aunque existen varios candidatos para esta función, según hemos visto en apartados anteriores, como los nucleótidos cíclicos, las poliaminas, el ión calcio o también el pH intracelular por mediación de la actividad glicolítica (Rubin y Fodge 1974), no hay ninguna prueba definitiva que señale a alguno de ellos como el factor regulador primordial de la iniciación. Téngase en cuenta que aunque pueda demostrarse la necesidad de un determinado componente, ello no constituye una prueba de que sea realmente el factor regulador, a menos que se demuestre que su concentración intracelular oscila a lo largo del ciclo traspasando la concentración umbral y manteniéndose por debajo de la misma antes de la iniciación de la síntesis de DNA.

Un problema muy controvertido en relación a la síntesis del DNA es el de su posible relación con la membrana celular en las bacterias o con la envoltura nuclear en las células eucariotas. La noción de que el cromosoma bacteriano está unido a la membrana fue propuesta por Jacob, Brenner y Luzin (1963) como un elemento necesario del modelo del replicón: Ellos postulaban que el complejo cromosoma-membrana desempeñaba el papel de aparato mitótico primitivo dirigiendo el reparto de los cromosomas hijos. Este postulado descansaba en gran parte en los estudios de microscopía electrónica realizados por Ryter (1960), que demostró la relación entre una invaginación del plasmolema conocida como mesosoma y el DNA en bacterias gram positivas como el bacilo subtilis (*B. subtilis*), aunque en bacterias gram negativas como el colibacilo (*E. coli*) esto es menos evidente. Para comprobar esta relación se han realizado bastantes trabajos utilizando diversas técnicas de fraccionamiento celular, con el objeto de aislar complejos DNA-membrana. Dworsky y Schaechter (1974), por ejemplo, consiguen

obtener la llamada "banda M", un complejo DNA-membrana, que dadas las especiales condiciones de su técnica experimental hay que admitir como una unión existente en condiciones naturales y no como un artefacto de preparación. Esta técnica consiste esencialmente en añadir al lisado celular unos cristales de superficie hidrofóbica formados por la mezcla del detergente iónico "Sarcosil" y magnesio; las membranas se adhieren a la superficie de los cristales no pudiendo formar bolsas en cuyo interior pudiera quedar retenido artificialmente el DNA presente en el lisado celular. Según estos autores solamente un 4% de la membrana, como máximo, participa en la unión con el DNA, siendo el número de puntos de unión del orden de 4×10^5 . Este último dato es especialmente interesante ya que coincide con el número de horquillas de replicación por célula en condiciones de cultivo de crecimiento rápido, con lo cual se refuerza la idea de que el cromosoma se une a la membrana a nivel de la horquilla de replicación, es decir, que el proceso de réplica del DNA ocurriría estrechamente unido a la membrana.

En los eucariotas la evidencia a favor de la implicación de la membrana, en este caso la de la envoltura nuclear, en la síntesis de DNA es mucho menos fuerte y, en realidad, hay abundantes datos en contra. Se han realizado dos tipos de experimentos, unos basados en el fraccionamiento celular y otros en la autorradiografía previa pulsación con timidina H-3. Empleando la técnica de la banda M, antes mencionada, combinada con pulsaciones de marcado del DNA, Hanaoka y Yamada (1971) y Mizuno, Stoops y Sinhu (1971) encuentran que el DNA recién replicado se asocia a la fracción de membrana nuclear y concluyen que los puntos de unión deben corresponder a los orígenes y a las horquillas de replicación. Estos resultados están en contradicción con los de Franke et als. (1973) basados en el análisis de membranas nucleares purificadas a partir de células hepáticas, estos autores encuentran que el DNA unido a las membranas incorpora el trazador con menor intensidad que el resto del DNA, excepto en la parte final del intervalo S. Estos resultados niegan la relación entre membrana nuclear y replicación del DNA y concuerdan con el conocido hecho de la unión de la heterocromatina, que se replica tardíamente, a la cara interna

de la envoltura nuclear.

En cuanto a los experimentos utilizando la técnica autorradiográfica, si bien inicialmente se obtuvieron resultados a favor de la unión membrana-complejo de replicación, por ejemplo, Comings y Kakefuda (1968), posteriormente, en experimentos más rigurosos se ha hallado lo contrario, Wise y Prescott (1973) y Huberman (1974), este último, en células CHO, ha encontrado marcado autorradiográfico en todo el núcleo al cabo de una pulsación de 0,5 minutos, lo cual permite prácticamente descartar la posibilidad de que el complejo de replicación esté en la membrana y que el DNA allí sintetizado y marcado pase a ocupar posiciones más centrales. Comings y Okada (1974) llegan a una conclusión semejante y explican los falsos resultados positivos obtenidos en otros experimentos mediante el hecho de que al haber más densidad de DNA en la parte periférica del núcleo (heterocromatina) la probabilidad de encontrar marcado autorradiográfico en esta región es mayor que en la parte central del núcleo y, especialmente, en S tardío cuando se replica la heterocromatina periférica.

La hipótesis de un complejo de replicación del DNA cromosómico unido a la envoltura nuclear en los eucariotas debe, por tanto, ser desechada.

2.4.3 El sistema enzimático de la replicación del DNA

Trataremos ahora brevemente del sistema enzimático que interviene en la síntesis del DNA. Como en muchos otros aspectos de la Biología celular, el sistema enzimático que nos ocupa es relativamente bien conocido en las bacterias, y, en especial, en E. coli, mientras que muy poco se sabe de él en las células de los organismos superiores. En el primer caso, no solamente se conocen los enzimas que intervienen sino que, además, empieza a ser conocida la relación entre cada uno de estos enzimas y el patrón global de la réplica cromosómica. En la exposición de todo lo referente al sistema enzimático bacteriano nos basaremos fundamentalmente en la revisión realizada por Geftter (1975). El proceso de replicación cromosómica en procariotas y virus posee unas características que se suponen de tipo general y que, de momento, han sido comprobadas directamente en las bacte-

rias E.coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhomurium y en los bacteriófagos X y T4 : La réplica se inicia en un único punto fijo (origen) y se propaga en sentidos opuestos (réplica bidireccional) mediante dos horquillas de rplificación. El origen suele localizarse en los genes cuyos productos desempeñan alguna función necesaria para la replicación. Asimismo, es conocida la existencia de algunas excepciones a la réplica bidereccional (fagos P2, 186 y DNA mitocondrial).

En la réplica cromosómica bacteriana intervienen muchas proteínas, algunas de función bien determinada, y otras, cuyo papel se conoce de forma más superficial : El grupo más estudiado lo constituyen las DNA-polimerasas, que se halla formado por tres tipos moleculares completamente distintos denominados I, II y III. Las tres enzimas sintetizan DNA utilizando un molde de DNA, añadiendo nucleósidotrifosfatos al extremo 3' de la cadena y liberando un pirofosfato en cada condensación. La cadena crece en la dirección 5'-3'. Las diferencias entre las tres enzimas radican en la velocidad de catálisis, en sus actividades nucleasa asociadas y en su significación funcional in vivo.

La DNA-polimerasa I de E. coli está formada por una cadena PP de 109.000 daltons y lleva conjugado un átomo de zinc. Existen unas 400 moléculas de esta clase por célula. Se une al DNA monocatenario y a las interrupciones del enlace fosfodiéster (mellas) de una cadena en el DNA bicatenario. Además de su actividad polimerasa, posee actividad exonucleasa 3'-5', que le permite realizar la "corrección" de la copia durante el proceso de replicación, detectando nucleótidos incorrectamente incorporados y eliminándolos. También tiene actividad exonucleasa 5'-3', que le permite eliminar los dímeros de timina producidos por la radiación ultravioleta, por lo que las bacterias mutantes para esta proteína son más sensibles a la luz ultravioleta. La actividad exonucleasa 5'-3' de esta enzima es, asimismo, responsable de la digestión del RNA cebador que encabeza la síntesis de cada fragmento de DNA y mediante la actividad polimerasa lo substituye por el correspondiente DNA. Estas funciones dependientes de la actividad exonucleasa 5'-3' parece que son las propias de esta enzima in vivo, y, también, la prolongación de los fragmentos de Okazaki (ver más adelante).

La DNA-polimerasa II de E.coli es una cadena PP única de un peso molecular de 90.000 daltons y que se halla a la concentración de 40 moléculas por célula. No se une fuertemente al DNA monocatenario ni a las mellas del DNA bicatenario. Su actividad polimerasa específica es solamente un 10% de la actividad de la DNA-polimerasa I, y, a diferencia de esta última, su actividad polimerasa disminuye cuando la cadena molde posee más de 50 nucleótidos, lo cual es indicativo de que la superestructuración del DNA interfiere con la acción de la enzima. No es capaz por sí sola de desplazar una cadena de DNA apareada con su complementaria durante la síntesis, requiriendo para ello la presencia de otra proteína denominada "proteína desplegador". Su función fisiológica consiste en la reparación de "lesiones" producidas por la luz ultravioleta. Se admite que normalmente no interviene en la réplica del DNA, excepto en el caso de ausencia o defecto de la DNA-polimerasa I, substituyéndola en este caso en la prolongación de los fragmentos de Okazaki.

La DNA-polimerasa III de E.coli está formada por dos cadenas PP, una de 140.000 daltons y otra de 40.000. Cada célula posee unas 10 moléculas de esta enzima. Además de su actividad polimerasa de alta actividad catalítica, tiene actividades exonucleasa de los tipos 3'-5' y 5'-3'. Interacciona y se une con otras proteínas que intervienen en la síntesis del DNA. Su componente catalítico está codificado por el gen dnaE. Al igual que la DNA-polimerasa II, su actividad catalítica en la síntesis de DNA disminuye si la cadena molde se alarga más allá de los 50 nucleótidos; para copiar moldes largos de DNA la DNA-polimerasa III requiere la presencia de ATP y de las denominadas "Proteína I" y "Proteína II". El ATP y la Proteína I, también denominada Copolimerasa III, serían necesarios para producir un cambio de conformación de la enzima, lo cual le permitiría funcionar independientemente de la superestructuración del DNA. La función fisiológica de la DNA-polimerasa III consiste en catalizar la síntesis del DNA durante el proceso de réplica. Resumiendo las funciones fisiológicas de las tres DNA-polimerasas bacterianas, podemos decir que la III cataliza la elongación de la cadena dando lugar a los fragmentos de Okazaki, que son

prolongados por la polimerasa I (proceso de maduración). La DNA-polimerasa III es esencialmente una enzima de reparación de lesiones y auxiliar de la maduración.

Además de las DNA-polimerasas intervienen en la réplica del DNA otras enzimas, que en su mayor parte están bastante peor caracterizadas: La polinucleótidoligasa, que interviene después de las polimerasas uniendo los fragmentos contiguos. La proteína codificada por el gen dnaG, necesaria para la iniciación de la síntesis de los fragmentos pero no para su prolongación. Las proteínas de relajación de la superhélice o "girasa", que eliminan la tensión provocada por el desplegamiento de la doble hélice. Las denominadas "proteínas que se unen al DNA", ya que se aíslan por cromatografía de afinidad sobre DNA monocatenario; también se las conoce como proteínas "desplegadas" pues despliegan la doble hélice y se unen al DNA monocatenario, extendiéndolo e impidiendo el autoapareamiento. Estimulan la actividad de la DNA-polimerasa II, probablemente evitando la superestructuración del DNA. Y, finalmente, hay que anotar las RNA-polimerasas que intervienen en el proceso sintetizando las cabezas de los fragmentos constituidas por el RNA cebador.

Siguiendo a Geftter (1975), podemos esquematizar la intervención del sistema enzimático descrito en el proceso de replicación de la siguiente manera: Desplegamiento de la doble hélice por acción de una "proteína desplegada del DNA", la tensión creada por este desplegamiento sería suprimida mediante la intervención de una "girasa" o "proteína relajadora de la superhélice". La iniciación propiamente dicha de la cadena no se realiza en forma de DNA sino que previamente se incorpora un segmento de RNA, denominado RNA cebador, que podría ser sintetizado in situ por una RNA-polimerasa-DNA dependiente o bien, incorporarse una molécula de RNA preformada. El RNA cebador sería continuado en forma de DNA mediante la acción catalítica de la DNA-polimerasa III y a medida que la elongación de la cadena va progresando, la proteína desplegada se desprendería de los puntos sobrepasados para unirse a las cadenas parentales en puntos más avanzados. Ambas cadenas serían sintetizadas fragmentariamente (fragmentos de Okaza-

ki); puesto que las DNA-polimerasas solo sintetizan DNA en el sentido 5'-3', una de las cadenas será sintetizada en el mismo sentido que el del movimiento de la horquilla de replicación y la otra en sentido opuesto, debido al antiparalelismo de las mismas. La DNA-polimerasa III se desprendería del fragmento que está sintetizando, en la proximidad del RNA cebador del fragmento de Okazaki que le precede, incorporándose entonces la DNA-polimerasa I que continuaría la síntesis del fragmento (maduración) y digeriría después el RNA cebador substituyéndolo por DNA. La DNA-polimerasa III podría iniciar otro ciclo uniéndose a un RNA cebador recién formado. Una vez todo el RNA cebador que separa dos fragmentos de Okazaki contiguos ha sido eliminado y substituido por DNA, la enzima DNA-ligasa (polinucleótidoligasa) cataliza la síntesis de ambos mediante la formación de un enlace fosfodiéster.

El sistema enzimático eucariota de replicación del DNA es mucho menos conocido. Dentro de lo poco que se sabe, las DNA-polimerasas son los componentes más conocidos. El análisis genético de las DNA-polimerasas ha sido posible en las bacterias gracias a la existencia de mutantes para esta actividad enzimática, lamentablemente no se han podido aislar mutantes de esta clase entre células eucariotas. Otra diferencia entre pro y eucariotas en relación a estas enzimas es que las DNA-polimerasas eucariotas carecen de actividad exonucleasa (Geftter 1975). Bollum y Chang (1974) han estudiado la actividad DNA-polimerasa en diversas fuentes dentro de las células de mamífero: Médula ósea, hígado, células L. A parte, de la DNA-polimerasa mitocondrial, hallan otras dos formas, una DNA-polimerasa de coeficiente de sedimentación en la ultracentrífuga de 3,4 S que se aísla del núcleo y del citoplasma y otra de mayor peso molecular que se obtiene únicamente del citoplasma. La DNA-polimerasa de alto peso molecular se compone en realidad de dos moléculas de diferente coeficiente de sedimentación, 6 S y 8 S, que posiblemente comparten algunas subunidades y no habiendo sido posible obtenerlas en forma pura por separado, Bollum y Chang las designan globalmente como DNA-polimerasa 6-8 S.

Ambas formas requieren molde, cebador, deoxinucleósidotrifosfatos y ca-

ción divalente (magnesio o manganeso). La forma 3,6 S es de pH óptimo alcalino (8,6) y la forma 6-8 S es de pH óptimo neutro. Se supone que esta última es la que interviene realmente en la réplica del DNA ya que su concentración aumenta proporcionalmente a la frecuencia de la reproducción celular : Así, por ejemplo, durante la regeneración hepática la DNA-polimerasa 6-8 S aumenta su concentración, variando este aumento de 3 a 12 veces en distintos experimentos. Por otra parte, la concentración de la forma 3,4 S no se modifica sensiblemente durante dicho proceso. Cabe suponer que esta última sería una enzima constitutiva responsable de la reparación del DNA, mientras que la forma de alto peso molecular sería responsable de la réplica del DNA y su concentración sería regulable de acuerdo con las necesidades de la reproducción celular.

Baril et als. (1974), trabajando en hígado normal y regenerante y en hepatomas han llegado a resultados comparables : Consiguen aislar dos formas, que denominan DNA-polimerasa I (de 30.000 daltons) y DNA-polimerasa II (de 250.000 daltons). Ya que la metodología para la purificación enzimática es distinta de la utilizada por Bollum y Chang (1974) no pueden hacerse correspondencias con seguridad, pero es tentador suponer que la DNA-polimerasa I corresponde a la forma 3,4 S de estos últimos autores y la DNA-polimerasa II a la forma 6-8 S, ya que su comportamiento en diversas situaciones es similar. La DNA-polimerasa I (Baril) se encuentra en el núcleo y en el citoplasma y su concentración no se modifica con el grado de proliferación celular. La DNA-polimerasa II (Baril) se encuentra en el citoplasma, más específicamente en la fracción de membranas postmicrosómica, aumentando su concentración durante la regeneración hepática posthepatectomía parcial. A diferencia de lo que ocurre en el hígado normal, en el hígado regenerante de 24 horas después de la hepatectomía y en los hepatomas, la DNA-polimerasa II (Baril) se encuentra también en el núcleo. La hipótesis de que esta enzima, probablemente equivalente a la forma 6-8 S de Bollum y Chang, es la realmente implicada en la réplica del DNA parece, por tanto, bien fundamentada.

Un hallazgo especialmente interesante de Baril et als. (1974) es que

en sus condiciones experimentales, la DNA-polimerasa II (Baril) copurifica con otras enzimas, relacionadas con la síntesis de los precursores del DNA en la fracción de membrana postmicrosómica. Dicha fracción de membrana no contiene marcadores enzimáticos del plasmolema y su origen es desconocido. En esta fracción detectan, además de la DNA-polimerasa II (Baril), la Timidíkinasa, la Ribonucleótido-reductasa y la Timidilatosintetasa, en concentración correlacionada positivamente con la actividad proliferativa. Mediante subfraccionamiento de la membrana postmicrosómica en condiciones de solubilización de la misma, consiguen obtener unas partículas, cuyo diámetro medido por microscopía electrónica es de 8,5 a 12,0 nm, que contienen las cuatro actividades enzimáticas mencionadas. Estos resultados apuntan hacia la existencia de un complejo multienzimático para la biosíntesis del DNA en los eucariotas.

2.4.4 Patrón de replicación cromosómica

En el apartado anterior, en relación al sistema enzimático de la síntesis del DNA en los procariotas hemos enunciado ya la existencia de unas características generales muy sencillas acerca de la replicación cromosómica en bacterias y virus. En estos sistemas la información genética se halla en un único cromosoma circular, constituido por DNA, o RNA en algunos virus, no existiendo proteínas unidas al DNA y sin que, por tanto, pueda hablarse de cromatina tal como lo hacemos en los eucariotas. La réplica se inicia en un único punto y se propaga en ambos sentidos hasta que las dos horquillas de replicación se encuentran de nuevo. Examinaremos ahora el patrón de réplica cromosómica en los eucariotas. La mayor complejidad cromosómica de estos últimos es notoria considerando simplemente la cantidad de DNA y el número de cromosomas por célula, mientras que en una bacteria como E.coli el DNA se reduce a un único cromosoma de 1mm de longitud aproximadamente, una célula eucariota de mamífero, por ejemplo, consta de varios cromosomas y la longitud total del DNA de un núcleo, supuesto completamente extendido, alcanzaría bastantes centímetros. Si consideramos la réplica del cromosoma bacteriano como una unidad de replicación, en los eucariotas encontraremos varias de estas unidades por cromosoma. La organi-

zación en el espacio y en el tiempo de estas unidades de replicación, llamadas "replicones", constituye el patrón de replicación cromosómica, que es característico de cada tipo celular y, en los organismos pluricelulares, de la etapa del desarrollo que se considere. Con todo, existen unas características generales que comentaremos basándonos en las revisiones de Hand y Tamm (1974) y de Prescott (1976).

La mayor parte de conocimientos sobre el patrón de replicación en los eucariotas provienen de los estudios autorradiográficos de células que han recibido pulsaciones de timidina H-3. La observación de los resultados puede hacerse a dos niveles :

Preparando las células de la forma usual para la elaboración del cariotipo, se trabaja a un nivel de cromosoma entero. Si se realizan preparaciones de la misma población celular a distintos tiempos después de la pulsación, las células mitóticas cuyos cromosomas se observan en cada caso corresponden a distintas posiciones dentro del intervalo S en el momento de la pulsación. Mediante este procedimiento se obtiene una serie de imágenes autorradiográficas que permiten seguir el curso de la replicación a lo largo del cromosoma, es decir, determinar el orden de replicación de las diferentes partes del cromosoma. Debido al enorme sobreplegamiento de la fibra elemental de cromatina que posee el cromosoma mitótico, la resolución de esta técnica es relativamente pobre, aunque, como mínimo, permite distinguir los cromosomas o las regiones cromosómicas de replicación tardía ("late replicating segments"), es decir, las partes que se replican en la etapa final del intervalo S. La distribución en el cariotipo de estas regiones de replicación tardía es característico de cada tipo celular y se corresponden aproximadamente con las regiones heterocromáticas de la cromatina interfásica (Lima-de-Faria 1969 y Mitchison 1971).

En un segundo nivel, propiamente molecular, la preparación del material para la autorradiografía consiste en la obtención de fibras de cromatina extendidas, lo cual puede conseguirse mediante la clásica técnica de Cairns aplicada a células de mamífero (Cairns 1966 y Huberman y Riggs 1966) basada en la adsorción de las fibras sobre la membrana de una cámara dialí-

tica o mediante la técnica más reciente y sencilla de Lark et als. (1971), que permite la extensión directa de las fibras sobre un portaobjetos. Otra técnica importante en este campo es el marcado doble del DNA en dos generaciones sucesivas con timidina radiactiva (C-14 o H-3) y con Bromodeoxiuridina (BdU).

La duración del intervalo S, que en células de mamíferos y otros vertebrados es del orden de 6 u 8 horas, viene determinada por la cantidad de DNA cromosómico y por la velocidad global de síntesis del polinucleótido. A su vez, esta velocidad global, depende de la frecuencia de iniciación de replicones y de la velocidad de elongación de los mismos. En células L-929, derivadas de fibroblasto de ratón, Hand y Tamm (1974) han determinado velocidades de elongación de 0,8 a 0,9 micras/min. Prescott (1976) revisa datos relativos a distintas líneas celulares de mamífero y da una velocidad media de 0,9 micras/min. Leroy et als. (1975) han medido la velocidad de elongación de los replicones en células endometriales in vivo en condiciones control y después de estimular con Estradiol : En los animales control se midió una velocidad de 0,30 micras/min y en los tratados con la hormona determinaron un valor sensiblemente mayor, 0,45 micras/min, demostrando claramente el efecto del estrógeno sobre la elongación de los replicones en la célula endometrial.

Un replicón viene definido por un único origen , realizándose la réplica simétricamente en ambos sentidos a partir del mismo, de modo que en las imágenes autorradiográficas el origen corresponde al punto medio del trazado de cada replicón. La iniciación de la síntesis de DNA ocurre multifocalmente, como grupos de iniciaciones sobre áreas topográficamente contiguas del molde. Prescott, en la revisión antes mencionada, define el concepto de "banco de replicación" como un conjunto de replicones de iniciación simultánea. Cabe pensar que los miembros de un mismo banco sean "encendidos" por la misma señal, sin embargo, hay que tener en cuenta que los distintos replicones de un banco pueden pertenecer a grupos alejados, en realidad, un banco está formado por grupos de replicones dispersados por todo el juego de cromosomas. El proceso prosigue en forma de ráfagas de

iniciación, comprendiendo cada ráfaga los distintos grupos de replicones que constituyen un banco. Cada tipo celular se caracteriza por un patrón invariante de replicación, de modo que el orden de encendido de los distintos bancos se mantiene a través de sucesivas generaciones celulares; esto ha podido demostrarse en Physarum polycephalum mediante la técnica del doble marcado Timidina C-14/Budr antes mencionada, aprovechando la perfecta sincronía de iniciación de S de los núcleos del mixomiceto (Braun y Willi 1969). Además, de forma general en todos los tipos celulares estudiados, la heterocromatina (cromatina condensada en la interfase) se replica más tardíamente que la eucromatina (cromatina laxa en la interfase); como ejemplo característico tenemos la cromatina de Barr, constituida por un cromosoma X condensado, cuya réplica es siempre diferida con respecto al otro cromosoma X. También se ha observado que el DNA rico en pares GC se duplica al principio del intervalo S, mientras que el que lo hace hacia el final es más rico en pares AT, desconociéndose, por el momento, cuál es la significación de este dato, ya que según Bostock y Prescott (1971) no tiene relación con la réplica diferida de la heterocromatina.

Mediante el método autorradiográfico tras cortas pulsaciones con timidina H-3, Huberman y Riggs (1968) pudieron determinar la longitud de los replicones en células de hámster y en células HeLa, obteniendo valores entre 7 y 100 micras. Estos resultados, confirmados por otros autores, permiten calcular el número de replicones por genoma haploide de una célula de mamífero en aproximadamente 30.000. Para el cálculo se toma como base de partida una longitud media del replicón de 30 micras y una longitud total de DNA cromosómico por genoma haploide de 90 cm. Además, conocidos la velocidad media de elongación y la longitud media de los replicones puede determinarse el tiempo medio necesario para la duplicación de cada unidad de replicación, este último dato unido al de la duración del intervalo S (7 horas por término medio) permite determinar el número de bancos de replicación, el cual, según Prescott (1976) sería del orden de 25 ó 30 por genoma haploide, conteniendo cada banco unas mil unidades de replicación.

Las conocidas variaciones en la duración del intervalo S en diferentes

fases del desarrollo, que si bien menos importantes que las del intervalo G₁, son de gran consideración en algunos casos como durante el desarrollo de los anfibios, donde la velocidad de síntesis de DNA en los blastómeros es cientos de veces superior a la de las células adultas. En este caso la diferencia de velocidad global es debida a una diferencia en el número de puntos de iniciación, es decir, de replicones, que es mucho mayor en las células embrionarias. Al haber más replicones, éstos son más cortos con lo cual disminuye el tiempo necesario para la réplica (Callan 1972). Estas variaciones del patrón de replicación indican que en los eucariotas la determinación de los puntos de iniciación está sometida a un control mucho más complejo que en los procariotas. En estos últimos, su único replicón tiene un origen fijo en un punto genéticamente definido de su molécula circular de DNA. En los eucariotas, por el contrario, la situación de los orígenes de replicación puede variar, aunque sea por desaparición simple de algunos sin cambio en los demás, a lo largo del desarrollo.

2.4.5 Síntesis e incorporación al cromosoma de los componentes proteicos

El cromosoma eucariótico contiene, además de DNA, otros componentes, histonas, proteínas no histonas de la cromatina (NHC) y RNA asociado a la cromatina. El estudio de la duplicación de los cromosomas debería incluir el de la síntesis e incorporación al cromosoma de los otros componentes. Las NHC y el RNA cromosómico son componentes muy heterogéneos y distintos, cualitativa y cuantitativamente, en diferentes tipos celulares, y aun en el mismo tipo de célula en distintas condiciones de desarrollo o de cultivo. Estos componentes cuyo papel en la estructura y en la función de la cromatina es muy poco conocido, no poseen un patrón de duplicación en el ciclo comparable al del DNA ya que, globalmente considerados, son sintetizados y degradados continuamente a lo largo del ciclo. Aunque de hecho estudios más detallados (Weintraub 1974) han demostrado que determinadas NHC son sintetizadas en etapas específicas del ciclo celular, éstas, en general, no son coincidentes con el intervalo S.

En el caso de las histonas la situación es muy diferente. Se hallan en la cromatina en la misma proporción en peso que el DNA y la composición

cualitativa en histonas es la misma en todas las células eucariotas, con muy escasas excepciones. Además, se trata de proteínas extraordinariamente conservadas a lo largo de la evolución biológica, siendo muy pocas las diferencias en la secuencia de AA de una determinada histona al comparar diferentes especies biológicas, incluso muy alejadas filogenéticamente. Aunque existe un recambio metabólico de histonas a lo largo de todo el ciclo en algunos tipos celulares, es siempre de poca intensidad. El período de síntesis de las histonas (duplicación de su cantidad) coincide exactamente con el del DNA. Las histonas son sintetizadas en el citoplasma y pasan con extraordinaria rapidez (10 segundos) al núcleo, donde se incorporan a la cromatina (Weintraub 1972). Durante el intervalo G1 no se detecta RNA mensajero de histonas en el citoplasma y en células bloqueadas en la frontera G1/S mediante altas concentraciones de timidina, se ha observado que la síntesis de los mRNA de las histonas se desencadena inmediatamente después de liberar las células del bloqueo. (Breindle y Gallawitz 1973). Es evidente, por tanto, que alguna señal induce la transcripción de los genes de las histonas al iniciarse la síntesis del DNA, de modo que la síntesis de los dos componentes fundamentales de la cromatina quede perfectamente sincronizada. Stein et als. (1975) han reconstruido la cromatina utilizando proteínas NHC de células en fase S y de células en fase G1; en el primer caso, la cromatina reconstruida transcribe las secuencias de los mensajeros de las histonas y, por el contrario, no lo hace en el segundo caso. Los autores de este trabajo concluyen de estos resultados que la transcripción de los genes de las histonas es regulada durante el ciclo por mediación de proteínas NHC. Podría formularse la hipótesis de que determinadas NHC, elaboradas por la célula únicamente en el intervalo S, se unirían al complejo DNA-histonas, de forma específica en la región cromosómica correspondiente a los genes de las histonas, activando la transcripción de los mismos.

Esta sincronización de la síntesis de DNA con la de las histonas responde a la necesidad estricta de ambos componentes para la estructuración de la cromatina. Las histonas H2a, H2b, H3 y H4 forman una estructura glo-

bulas denominada nucleosoma, que se halla constituido por dos moléculas de cada una de estas histonas. Los nucleosomas se disponen uno tras otro a modo de cuentas de un rosario y el DNA se arrolla sobre los mismos; la histona H1 se coloca probablemente entre los nucleosomas interaccionando independientemente con el DNA (Bradbury 1975 y Elgin y Weintraub 1975). Esta es, en pocas palabras, la imagen actual de la estructura elemental de la cromatina; evidentemente, la cadeneta de nucleosomas debe, a su vez, superestructurarse para dar lugar al cromosoma tal como se observa en la mitosis, de ello nos ocuparemos más adelante. Lo que queremos remarcar aquí es que la estricta complementariedad entre histonas y DNA en la cromatina requiere la síntesis coordinada de ambos componentes para la correcta duplicación del cromosoma. Esta dependencia es tal que si experimentalmente se inhibe la síntesis de DNA también se inhibe indirectamente la de las histonas. Además, la inhibición de la síntesis proteica inhibe no sólo la iniciación, sino también, aunque sólo parcialmente, la continuación de la síntesis de DNA una vez iniciada (Gautschi y Kern 1973), lo cual, según Weintraub (1972) sería atribuible fundamentalmente a la inhibición de la síntesis de las histonas, cuya incorporación a la horquilla de replicación sería indispensable, *in vivo*, para la progresión de la síntesis de DNA. Este autor, en el trabajo citado, aporta pruebas en apoyo de esta idea: La síntesis de DNA en los eritroblastos de pollo es insensible a análogos del triptófano, que afectan a la síntesis proteica en general y, en cambio, es muy sensible a la canavanina que es un análogo de la arginina y cuyo efecto inhibitorio sería específico de las proteínas ricas en este aminoácido como las histonas.

Un aspecto de capital importancia es el de la incorporación de las histonas sintetizadas en el citoplasma al DNA recién replicado para dar lugar a los nuevos cromosomas. Este problema ha sido abordado por Weintraub (1974) utilizando un ensayo de resistencia del DNA de cromatina de eritroblasto de pollo a la acción de la DNAasa pancreática. Este ensayo se funda en que el grado de digestibilidad del DNA dependerá de su interacción con proteínas de la cromatina, esencialmente las histonas, que pueden mo-

dificar la accesibilidad del ácido nucleico al ataque de las nucleasas. El DNA de la cromatina es mucho más resistente a la digestión por la DNAasa pancreática que el DNA libre. Mediante la utilización de pulsaciones de timidina H-3, Weintraub puede distinguir el DNA recién replicado de diferentes "edades" y encuentra que durante el primer minuto de la réplica el DNA se halla en una forma muy resistente, posiblemente protegido por el complejo enzimático de la horquilla de replicación; al cabo de dos minutos la sensibilidad del DNA a la nucleasa aumenta hasta el valor propio de la cromatina, lo cual indica que las histonas se incorporan al DNA recién sintetizado dentro de estos dos primeros minutos, constituyéndose el complejo DNA-histonas característico. Las principales conclusiones que el autor saca de sus resultados experimentales son las siguientes : Durante el proceso de replicación, el DNA se asocia a un "orgánulo nuclear" (el complejo enzimático de replicación) que le confiere una elevada resistencia a la nucleasa. Las histonas recién sintetizadas se incorporan exclusivamente en la horquilla de replicación no existiendo desplazamiento de histonas a lo largo del DNA en la célula intacta.

El modelo de Watson y Crick para la réplica semiconservadora del DNA, incluyendo naturalmente muchas modificaciones de detalle (Lehninger 1972), constituye la base de la reproducción cromosómica, que, en los eucariotas, debe ser completado con el mecanismo molecular de la incorporación de las histonas a las nuevas moléculas de DNA. Muy poco se sabe de este aspecto, a parte de los resultados en cromatina de eritroblasto de pollo obtenidos por Wintraub (1972) y que hemos comentado anteriormente y también del trabajo de Tsanev y Russev (1974) comentado por Elgin y Weintraub (1975) en su amplia revisión sobre la cromatina. En dicho trabajo se realizó un doble marcado de las células con bromodeoxiuridina H-3 y leucina C-14; la cromatina aislada y desnaturalizada era irradiada con luz U.V. con el fin de romper fundamentalmente la hebra nueva que contenía la Budr H-3, lo cual permitía separar posteriormente, mediante centrifugación en gradiente de sacarosa, las cadenas nuevas de las parentales en función de la diferencia de tamaño de los fragmentos según su procedencia. Con este plan-

teamiento experimental, Tsanev y Russev demostraron que las nuevas moléculas de histona (marcadas con leucina C-14) acompañaban siempre a las cadenas nuevas de DNA (marcadas con bromodeoxiuridina H-3). Estos resultados indican que al separarse las dos cadenas parentales de DNA durante la síntesis, las histonas viejas se distribuyen entre ambas y las moléculas de histona nuevas se incorporan a las cadenas de DNA recién sintetizadas, es decir, el patrón de réplica del componente proteico de la nucleohistona se adaptaría al patrón semiconservativo característico de la replicación del DNA. Cabe esperar que los actuales estudios sobre la estructura del nucleosoma y su interacción con el DNA permitan en un futuro próximo una comprensión más profunda de la mecánica molecular de este proceso.

2.5 El intervalo G2 y la división celular

2.5.1 El intervalo G2 como fase preparatoria de la división celular

Una característica fundamental del ciclo celular, generalizable a la mayoría de células eucarióticas y procarióticas, es la existencia de un lapso de tiempo entre la terminación de la síntesis de los componentes cromosómicos y la iniciación morfológica de la división celular. A este lapso se le conoce como intervalo G2 y algunos autores (Prescott 1976) lo consideran como una parte de la división celular, o, al menos, como una fase preparatoria de la misma. Debe tenerse en cuenta la posibilidad de que los cambios morfológicos del núcleo, que definen el comienzo de la división celular mitótica en los eucariotas, vengan determinados por acontecimientos previos al nivel molecular, cuyo desarrollo tenga lugar a lo largo del G2. Además, aunque el "contenido operativo" del intervalo G2 es tan escasamente conocido como el del intervalo G1, su significación fisiológica es completamente distinta de la de este último. En anteriores apartados hemos afirmado que es muy probable que gran parte del tiempo que una célula invierte en G2 no corresponda en realidad a un progreso en el ciclo de reproducción, sino, más bien, a un estado "fuera del ciclo". Esta afirmación la fundamentábamos en la extremada variabilidad inter e intrapoblación de la duración de este intervalo. El caso del G2 es completamente distinto, si bien su duración no es absolutamente constante, e incluso en algunos tipos celulares puede darse una detención de duración indefinida en el mismo, la variabilidad es muy inferior a la del G1. En células de mamífero el intervalo G2 raramente es inferior a las 2 horas o superior a las seis (Mitchison 1971). En todo caso, posee una extensión "propia" inevitable, en el transcurso de la cual tienen lugar regular y ordenadamente los procesos bioquímicos que conducen a la división celular.

Ya que durante el intervalo G2 la célula no experimenta modificaciones morfológicas importantes, el estudio de este intervalo se ha dirigido directamente al nivel molecular. La principal dificultad con que se

tropieza es la falta de una buena técnica de sincronización celular, que permitiera obtener poblaciones G2 razonablemente puras en cantidades suficientes para el análisis bioquímico. Si bien existen técnicas para bloquear células en partes específicas del ciclo, ninguna de las conocidas hasta ahora lo hace en la frontera S/G2. Esto obliga a utilizar poblaciones sincronizadas en otros puntos del ciclo más o menos alejadas del intervalo G2 siguiente, como la frontera G1/S o la mitosis. Consecuentemente, aunque se obtenga una buena sincronía en el punto de bloqueo, debido a las diferencias entre las distintas células en la velocidad de progresión por el ciclo, la sincronía se pierde durante el recorrido y nunca se obtiene una población G2 libre de contaminación por células en otras fases del ciclo. A causa de esta dificultad, el análisis bioquímico de poblaciones sincronizadas ha sido escasamente utilizado en el estudio del intervalo G2.

De la amplia revisión de Tobey, Petersen y Anderson (1971) y de la más breve de Prescott (1976) sobre el intervalo G2 resulta manifiesto que la aproximación mayormente utilizada para el análisis bioquímico de esta fase del ciclo ha sido el análisis de puntos de transición aplicado a poblaciones celulares sincrónicas y asincrónicas y empleando distintos inhibidores metabólicos, especialmente inhibidores de la transcripción y de la síntesis proteica. El efecto de los inhibidores sobre el flujo a través del G2 se mide observando las modificaciones en la frecuencia de iniciación mitótica. Siguiendo la nomenclatura de Pringle (1978), que ha sido presentada detalladamente en el apartado dedicado al intervalo G1, la mitosis es la "marca diagnóstica" del análisis de puntos de transición del intervalo G2, es decir, el primer acontecimiento del ciclo fácilmente detectable que dejará de producirse si un paso necesario del programa del G2 ha sido bloqueado. El tiempo que media entre el tratamiento con el inhibidor metabólico y el punto en que empieza a disminuir la frecuencia de iniciación mitótica indica la posición relativa de la fase sensible al inhibidor.

La Actinomicina D, inhibidor de la síntesis de RNA, y la Puromicina

y la Cicloheximida, inhibidores de la síntesis proteica, han sido los agentes más utilizados en esta clase de experimentos. El tratamiento con Actinomicina permite determinar el "punto de ejecución" (Pringle 1978) de la síntesis de RNA para la división celular, es decir, el punto del tiempo del intervalo G2 a partir del cual la transcripción ya no es necesaria para que tenga lugar la mitosis; las células que al administrar la droga ocupan posiciones anteriores a dicho punto no podrán dividirse, en cambio, las que ya lo hayan traspasado realizarán normalmente la mitosis. Aplicando el mismo razonamiento, la administración de Puromicina o de Cicloheximida y la medida de la frecuencia de iniciación mitótica a distintos tiempos permitirá determinar el punto de ejecución correspondiente. Aunque la posición de estos puntos varía de un tipo celular a otro, puede afirmarse que, en general, para que la mitosis se produzca normalmente es necesaria la transcripción entre el G2 medio y tardío, mientras que la síntesis proteica es necesaria hasta casi el final del intervalo (Prescott 1976). Tobey, Petersen y Anderson (1971) presentan dos tablas de puntos de ejecución, una de la transcripción y otra de la síntesis proteica, en las que aparecen datos correspondientes a diferentes tipos celulares y a distintos autores : En la mayoría de casos el punto de ejecución para la transcripción dista 2 o más horas de la división celular, mientras que el correspondiente a la síntesis proteica queda situado, generalmente, a menos de 30 minutos de la mitosis.

La relativa constancia del intervalo G2 y la regularidad de posición de los puntos de ejecución de la transcripción y de la síntesis proteica para la división celular permiten confirmar el concepto del G2 como un intervalo de intensa actividad biosintética dirigida a la división celular. Esta actividad, constituida por una serie de operaciones secuenciales, probablemente semejantes en muy diversos tipos de células, conduce inevitablemente a la mitosis, ya que una vez iniciada difícilmente puede ser detenida por influencias extracelulares fisiológicas.

Sin embargo, aunque de forma bastante excepcional, el intervalo G2 puede presentar discontinuidades en su programa, es decir, la célula

puede abandonar la preparación de la mitosis y permanecer indefinidamente fuera del ciclo en un estado que podríamos denominar $G_0(2)$, para distinguirlo del G_0 clásico o $G_0(1)$, en el que las células se detienen entre la mitosis y la síntesis de DNA. Antes de 1960 se admitía que en poblaciones celulares quiescentes, todas las células estaban detenidas en $G_0(1)$, ya que, generalmente, poco tiempo después del estímulo apropiado para la proliferación se produce una entrada masiva en el intervalo de síntesis de DNA. Aunque, en general, esto es una buena aproximación no es exacto en todos los casos. Así, en una serie de experimentos realizados a partir de 1959, Gelfant (1963 y 1975) descubrió que la frecuencia mitótica en la epidermis de la oreja del ratón, que es una población de recambio relativamente lento, aumentaba considerablemente a las pocas horas de haber aplicado el estímulo (corte). Especialmente interesante fue la observación de que una fracción de la población podía ser inducida a entrar en mitosis pocas horas después de incubar un fragmento de oreja en un frasco de Warburg conteniendo un medio nutritivo con glucosa. La brevedad del período entre el estímulo y la aparición de mitosis era sorprendente ya que la duración normal del intervalo S en estas células era de 19 horas. Marcando con Timidina- H^3 , Gelfant pudo probar que durante las primeras 18 h después del estímulo la reacción mitótica del tejido se hacía a expensas de células no marcadas. Con todos estos datos resulta irrefutable la existencia de células detenidas en G_2 en la epidermis de la oreja del ratón. Posteriormente se han ido descubriendo, por otros autores, diversas poblaciones celulares en estado $G_0(2)$; Tobey, Petersen y Anderson (1971) han revisado este punto y citan, entre otros, los siguientes ejemplos de poblaciones con una fracción más o menos importante de células en estado $G_0(2)$: Tejido osteogénico de conejo, esófago de pollo (en condiciones de ayuno), fibroblastos humanos in vitro (en la 48ª generación) y parénquima hepático de ratón.

En algunos eucariotas inferiores, como Amoeba proteus o Physarum polycephalum cuyos ciclos carecen de G_1 , el intervalo G_2 tiene mayor variabilidad y desempeña la función reguladora de la frecuencia del ciclo, que



en los demás casos depende del G1.

De todo lo anterior se puede concluir que el intervalo G2 contiene un punto en el cual el ciclo puede ser interrumpido sin efectos perjudiciales sobre la viabilidad celular. En la mayoría de células este punto sería traspasado con elevada velocidad específica, por lo que no representaría un paso limitante de la frecuencia del ciclo. En algunos casos, sin embargo, en este punto tendría lugar una transición de frecuencia más baja e influenciada por las condiciones del medio extracelular, con lo cual estaríamos ante una situación parecida a la del intervalo G1.

2.5.2 Condensación y relajación de la cromatina

Mitosis i meiosis, las dos formas de división celular usuales en los eucariotas, comportan un ciclo de condensación y relajación de la cromatina. En el intervalo G2, como en el resto de la interfase, los cromosomas se encuentran más o menos relajados y dispersos por todo el espacio nuclear, siendo imposible reconocer a un cromosoma como tal, ya que las fibras de los distintos cromosomas están entremezclados. En la profase, la envoltura nuclear se descompone en segmentos y la cromatina empieza un proceso de condensación progresiva cuyo producto son los cromosomas claramente individualizados de la metafase. El cromosoma metafásico está constituido por dos cromátidas unidas a nivel del centrómero. Cada cromátida consiste en una larguísima fibra muy empaquetada formada por DNA, histonas, RNA y proteínas no histonas. En la anafase las dos cromátidas de cada cromosoma se separan y prosiguen el movimiento en sentidos opuestos hasta que alcanzan los respectivos polos del aparato mitótico. Una vez reunidos los dos juegos de cromosomas hijos en los extremos opuestos de la célula se inicia la telofase, que consiste fundamentalmente en la relajación de los cromosomas y la reconstrucción de la envoltura nuclear.

La "raison d'être" de la condensación de los cromosomas en la división celular de los eucariotas, que no aparece en los procariotas, podría ser la de facilitar la separación de los cromosomas, que de estar extendidos, dados su número y su considerable longitud, sería una operación

de éxito muy improbable. En el curso de la evolución biológica, además de diversificación, se ha producido un aumento del nivel de complejidad, lo cual implica necesariamente una ampliación de la información genética celular. Existen dos tipos celulares, muy distantes en cuanto al nivel de complejidad, el procariota y el eucariota : Al primero de ellos, mucho más sencillo, le corresponde una cantidad de información genética que cabe en un único cromosoma circular de varias décimas de milímetro de longitud. Al segundo tipo una cantidad considerablemente mayor, que se distribuye entre varios cromosomas, que de estar completamente extendidos, sumarían una longitud total del orden de centímetros. Resulta razonable suponer que la aparición del aparato mitótico y de la condensación de los cromosomas en el curso de la evolución celular primitiva debieron constituir, junto con la formación del sistema intracelular de membranas y de las mitocondrias, uno de los primeros pasos hacia la formación del tipo celular eucariota. Sin ellos no hubiera sido posible la ampliación de la información genética, ya que sin una división celular capaz de distribuir equitativamente los cromosomas entre las células hijas, el genoma carecería de estabilidad, es decir, la mayor parte de células presentarían dotaciones cromosómicas desequilibradas y no serían viables. Precisamente esto es lo que ocurre, en cierta medida, en las células de los tumores malignos, donde son frecuentes las anomalías mitóticas (Hamperl 1967 y Grundmann 1967).

El objeto de este apartado es el estudio de los mecanismos de condensación y relajación cromosómicas y, también, el de las repercusiones de estas modificaciones estructurales sobre la actividad transcripcional de la cromatina.

Se acepta generalmente que la condensación mitótica de los cromosomas viene provocada por la síntesis o activación de uno o varios factores en la frontera G₂/profase. Este supuesto fue confirmado por los trabajos de Johnson y Rao (1970) y de Johnson, Rao y Hughes (1970) en los que mediante experimentos de fusión celular heterofásica, es decir, fusión de células en distinta fase del ciclo celular, mostraron como células HeLa

mitóticas tenían la capacidad de inducir la condensación cromosómica de núcleos interfásicos y que el factor de condensación de las células HeLa (humanas) era efectivo sobre células de especies filogenéticamente muy alejadas como el pollo, el sapo o el mosquito. Sin embargo, hasta hace pocos años, el conocimiento de la arquitectura molecular de la cromatina era tan esaso, que no podía ni pensarse en formular una hipótesis sobre el mecanismo de control del ciclo de condensación y relajación de los cromosomas. Pero a partir de principios de esta década, trabajos de diversos autores (ver Bradbury 1975) han conseguido obtener una imagen bastante clara de la interacción DNA-histonas, que constituye el armazón fundamental de la cromatina: Tanto los datos de la microscopía electrónica de fibras de cromatina extendidas como los estudios de digestión de las mismas con endonucleasas concordaban con una estructura globular de la cromatina. La imagen actualmente aceptada es la propuesta por Kornberg (1974) según la cual la cromatina se halla constituida por subunidades globulares denominadas nucleosomas; cada subunidad se compone de un complejo de 8 moléculas de histona (2 H3, 2 H4, 2 H2A y 2 H2B) asociado a un segmento de la molécula de DNA de unos 200 pares de bases de longitud. Los estudios de difracción de neutrones de la cromatina han demostrado que el nucleosoma tiene el octámero de histonas formando un núcleo en el centro de la partícula, mientras que el DNA está arrollado por encima (Bradbury 1975). Una fibra elemental de cromatina está constituida por un rosario de nucleosomas y los cortos segmentos de DNA que quedan entre los nucleosomas parece ser que interaccionan con la histona H1, que no forma parte del octámero.

La cadeneta de nucleosomas es el primer nivel en la estructura del cromosoma. Evidentemente, es necesaria una superestructuración para conseguir el empaquetamiento propio de un cromosoma metafásico. Entre este último y el primer nivel, existe una estructura intermedia, que fue descubierta por Du Praw (1968) antes de los estudios sobre la arquitectura molecular de la cromatina que hemos descrito; se trata de una fibra de

250-300 Å de diámetro que puede observarse en las imágenes electrónmicroscópicas de cromosomas enteros. Hasta ahora es desconocida la clase de plegamiento que transforma la cadeneta de nucleosomas extendida en esta fibra intermedia. En cuanto al de esta última para constituir el cromosoma metafásico parece ser que se trata, según las imágenes de la microscopía electrónica, de un plegamiento aparentemente irregular (Du Praw 1968), aunque esto no significa la ausencia de mecanismos organizadores del plegamiento. De hecho, cada cromosoma tiene una morfología característica y reproducible en cada mitosis, que ha de venir determinada por las características del plegamiento de la fibra intermedia. Probablemente, a lo largo de la fibra existe la "información para el plegamiento", en forma de lo que Wolfe (1972) denomina "plegadores" o regiones con capacidad de atraerse mutuamente, que hallándose espaciados a lo largo de la fibra, serían activados progresiva y ordenadamente durante el proceso de condensación profásica.

Una hipótesis general en relación a los mecanismos de control de la condensación de la cromatina, que resulta muy razonable, consiste en admitir que en estos mecanismos están implicadas modificaciones químicas de las histonas, inducidas por la activación de determinadas enzimas. Una modificación química de cualquier histona habrá de cambiar las interacciones de la histona con el DNA en todo el genoma. Todas las modificaciones de las histonas descubiertas hasta ahora afectan a la carga de los residuos básicos o a serinas y treoninas localizadas en o cerca de los segmentos básicos de dichas proteínas. (Bradbury 1975). En el modelo del nucleosoma las secuencias básicas de las histonas interactúan con el DNA en la parte exterior de la partícula y, por tanto, quedan accesibles a modificaciones enzimáticas. La histona H1 sería también accesible ya que está fuera del nucleosoma. De los estudios realizados a partir de esta hipótesis, los que han dado resultados más interesantes son los que se refieren a la fosforilación de la histona H1, revisados por Bradbury (1975), Prescott (1976) y Matthews (1978).

Diversos trabajos (ver Bradbury 1975) han permitido establecer los

siguientes hechos en relación a la fosforilación de la histona H1 : El contenido de fosfato de la histona H1 presenta una correlación positiva con la velocidad de reproducción celular en diversos modelos experimentales, entre ellos, la reproducción hepatocelular (Balhorn et als. 1971 y 1972). La fosforilación de la histona H1 se realiza en su mayor parte al final del intervalo G2; esto último ha sido comprobado en Physarum polycephalum (Bradbury et als. 1973) y también en células de mamífero (Gurley et als. 1973). El plasmodio Physarum polycephalum, cuyos núcleos inician sincrónicamente la síntesis de DNA y la mitosis, ha sido particularmente útil para estos estudios, permitiendo a Bradbury y cols. un análisis muy detallado del proceso. El contenido de fosfato de la histona H1 tiene un máximo 20 minutos antes de la mitosis, lo cual concuerda con la existencia, demostrada por el mismo grupo de investigadores, de un pico de actividad fosforilante que le precede. La actividad fosforilante es el resultado de un balance entre las actividades H1-kinasa y H1-fosfatasa. Según Matthews (1978), el control del contenido de fosfato de la histona H1 ejercido por la kinasa viene modulado por la fosfatasa, que acentúa y desplaza ligeramente el pico de fosforilación de la H1 en la frontera G2/M. Además, según el mismo autor, los diferentes efectos de los iones Ca y Mg sobre la actividad de la kinasa y de la fosfatasa sugieren la posibilidad de una modulación adicional por el cociente de concentraciones : Ca / Mg.

Todo lo anterior permite formular la hipótesis de que la variación cíclica de la actividad fosforilante sobre la histona H1 está implicada en el control de la división celular y que la fosforilación de la histona H1 representa el "disparador mitótico" que inicia la condensación de los cromosomas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el proceso de condensación debe ser relativamente complejo, dados los distintos niveles que se observan en la organización de la cromatina desde la cadeneta de nucleosomas al cromosoma metafásico. Además, aunque mediante estudios de resonancia magnética nuclear se ha comprobado que la interacción del DNA con la histona H1 se modifica considerablemente a consecuencia de la

fosforilación de esta última a nivel de las serinas 37 y 106 (Bradbury 1975) no se ha podido explicar satisfactoriamente cómo esta modificación de la interacción DNA-histona H1 determina la condensación de la cromatina.

Una vez realizado el estudio de los mecanismos del ciclo de condensación y relajación de la cromatina, pasaremos a revisar sus consecuencias en relación a la actividad transcripcional de la misma. La condensación de la cromatina anula casi por completo la síntesis de RNA durante la mitosis a excepción de la de algunas formas de RNA 4S y 5S (Prescott 1964). En la telofase, la síntesis de RNA se reanuda a medida que la cromatina se va relajando. El mecanismo de este bloqueo generalizado de la transcripción durante la mitosis es desconocido. Una posible explicación sería la de que debido al alto grado de empaquetamiento de la cromatina, el DNA sería inaccesible a las RNA-polimerasas. De hecho, durante la profase, una gran cantidad de proteínas nucleares pasa al citoplasma, es decir, la cromatina al condensarse desprende parte de sus componentes, perdiendo con ellos factores necesarios para la transcripción. Durante la reconstrucción nuclear telofásica, la relajación de la cromatina permitiría la recaptación de los componentes desprendidos y, por tanto, la recuperación de la actividad transcripcional.

Basándose en sus experimentos de trasplante nuclear en ovocitos de anfibio, Gurdon (1975) propone que el ciclo de condensación-relajación de la cromatina representa una oportunidad para el cambio de factores reguladores de la transcripción y por ello para la reprogramación genética de la célula. En efecto, durante la profase la cromatina quedaría "limpia" de proteínas reguladoras y en la telofase, no sólo se produciría la recaptación de parte o de todos los factores desprendidos en la profase, sino que proteínas sintetizadas en la interfase del anterior ciclo tendrían una oportunidad única para incorporarse a la cromatina. De modo que la reconstrucción nuclear podría realizarse sin cambios con respecto al núcleo de la célula madre, o bien, adquiriendo nuevos componentes y con ellos un nuevo programa de actividad transcripcional. Es

evidente que esta clase de mecanismo podría ser de importancia fundamental en la diferenciación celular.

2.5.3 El aparato mitótico y los movimientos cromosómicos

Según hemos visto en el apartado anterior, la mayor cantidad de información genética de las células eucariotas con respecto a las procariotas habría hecho necesaria la existencia de unos mecanismos muy especializados para la separación de los cromosomas hijos en la división celular, que no encontramos en los procariotas. Estos mecanismos consisten esencialmente en el empaquetamiento de la cromatina y en la formación y funcionamiento de un delicado sistema microtubular conocido como aparato mitótico, al que se debe el control del movimiento de los cromosomas y la generación de la fuerza motriz correspondiente. Tomaremos como base de nuestra revisión sobre el aparato mitótico y los movimientos cromosómicos la realizada por Mazia en 1961 (a), que actualizaremos con el comentario de los trabajos más recientes. Cuando no nos apoyemos en ninguna referencia especial, debe entenderse que la información procede de la revisión de Mazia o de la más reciente y breve del texto de De Robertis, Saez y De Robertis (1977).

El aparato mitótico fue definido por Mazia y Dan (1952) como "el conjunto de estructuras que constituyen las partes cromática y acromática de las descripciones clásicas de la mitosis. Esto incluye huso, centriolos, ásteres y, también, los cromosomas". Aunque usualmente sólo se considera aparato mitótico a la parte acromática, es decir, excluyendo los cromosomas, este concepto más amplio es útil porque el proceso mitótico depende del juego coordinado de todos estos componentes y porque, de hecho, están asociados físicamente en un cuerpo que puede ser aislado como una unidad. El aparato mitótico se origina en la profase como un gel muy ordenado que excluye a los orgánulos celulares debido, probablemente, a su elevada compacticidad.

La composición, estructura y propiedades físicas del aparato mitótico han sido investigadas por diversas técnicas : La microscopía de pola-

rización, la microscopía electrónica, la micromanipulación y, muy especialmente, las técnicas de aislamiento del aparato mitótico ideadas por Mazia, que han permitido su caracterización química.

A causa de su organización, el aparato mitótico es birrefringente; el estudio de esta propiedad mediante el microscopio de polarización proporciona datos muy importantes acerca de su estructura y de la dinámica funcional de la cariocinesis, ya que esta clase de microscopía permite la observación de células vivas. La birrefringencia positiva con respecto al eje del huso indica que el aparato mitótico se halla constituido por moléculas o complejos moleculares asimétricos, orientados paralelamente al eje del huso. La medida de la birrefringencia en distintas zonas del aparato mitótico, a distintos tiempos de la división celular y en condiciones experimentales diversas ha permitido aclarar su estructura y formular sólidas hipótesis sobre los principios de su funcionamiento. En tal sentido, cabe destacar los trabajos de Inoué (ver Mazia 1961 a y también Inoué 1978), que ha estudiado la relación entre la birrefringencia y la temperatura, mostrando que el efecto de esta última es reversible y que el aparato mitótico puede ser concebido como un gel en equilibrio sensible a la temperatura. El análisis termodinámico de los datos conduce a la idea de que la orientación molecular del aparato mitótico depende de un enlace débil. La conclusión de estos estudios de tipo cuantitativo concuerda con diversos datos cualitativos acerca de la extremada labilidad del aparato mitótico frente a la presión hidrostática, al mercaptoetanol, a la colchicina y a los alcaloides de la vinca que impiden la formación de los enlaces de ensamblado o polimerización de las subunidades que lo constituyen.

El aparato mitótico se halla constituido por fibras que se pueden clasificar en cuatro grupos: Astrales, cromosómicas, continuas e interzonales. Las fibras astrales presentan una distribución radial en cada uno de los polos del huso, alrededor de un centro organizador que en las células animales es un centriolo. Las fibras cromosómicas unen los cromosomas con los polos del huso. La unión de estas fibras con los cromoso-

mas se realiza en regiones especializadas denominadas centrómeros o cinetocoros, generalmente uno por cromátida, a nivel de la constricción primaria. El centrómero tiene forma de disco de 0.20 a 0.25 micras de diámetro y en sección transversal se distinguen dos capas: Una capa externa electrodensa de unos 300-400 Å de espesor, cuya cara exterior es convexa y se halla revestida de un material fibrilar. Por debajo de esta capa existe otra de menor densidad que contacta con las fibras de cromatina subyacentes. Se desconoce la naturaleza química de los centrómeros, pero se admite, por razones estructurales, que no es propiamente cromatina sino, más bien, un producto genético que se depositaría sobre la superficie de la constricción primaria del cromosoma. Las fibras continuas se extienden sin interrupción entre los dos polos y, finalmente, las fibras interzonales se observan entre los cromosomas ya separados en la anafase y la telofase. Si bien es indudable la existencia en cada polo de un centro organizador que orienta las fibras a su alrededor, por el momento, desconocemos en qué se basa esta acción organizadora. En las células animales, esta función viene desempeñada por un centriolo, aunque las fibras del huso no llegan hasta el centriolo mismo sino que generalmente terminan en el área densa pericentriolar. Sin embargo, en las células de los vegetales superiores no existen centriolos pero las fibras convergen igualmente hacia los polos como en los husos de las células animales.

La microscopía electrónica ha demostrado que las fibras del aparato mitótico se hallan constituidas por haces de microtúbulos, de estructura semejante a la de los que constituyen los cilios y los flagelos. Se trata de estructuras cilíndricas de unos 200 Å de diámetro, cuya pared está formada por partículas de unos 40 Å. Se admite que la formación y disolución del aparato mitótico al principio y al final de la mitosis dependería de un proceso de ensamblado reversible de estas partículas.

El estudio bioquímico del aparato mitótico pudo ser una realidad a partir del momento en que Mazia y Dan (1952) idearon una técnica que permitió por primera vez el aislamiento en masa del aparato mitótico. Utilizaron como material huevos de erizo de mar, en los que hay gran cantidad

de células en mitosis. Inicialmente emplearon el método de la solubilización selectiva, que consistía en estabilizar el aparato mitótico tratando los huevos con Etanol 30-40 % a -10°C y después dispersar el citoplasma de las células mediante un tratamiento con el detergente digitonina. Las preparaciones obtenidas con este procedimiento conservaban el aspecto normal y estaban libres de contaminación por otros componentes celulares. Posteriormente, idearon la técnica del aislamiento directo mediante tratamiento con Ditiodiglicol (DTDG). que consistía en tratar los huevos, una vez liberados de la membrana vitelina, con una solución de sacarosa conteniendo DTDG 0.15 M; en estas condiciones y agitando manualmente, las células se dispersaban y liberaban aparatos mitóticos estructuralmente intactos (Mazia 1961 b). El método del DTDG se funda en la hipótesis de que la organización del aparato mitótico depende de enlaces disulfuro, que pueden ser protegidos añadiendo un exceso de un compuesto que posea este tipo de enlace y que penetre fácilmente en la célula.

El aparato mitótico se compone fundamentalmente de proteínas, aunque contiene también RNA y polisacáridos. Los microtúbulos están formados por una proteína denominada tubulina, que forma dímeros de un peso molecular entre 110.000 y 120.000 daltons y unas dimensiones de $40 \times 80 \text{ \AA}$. El dímero se descompone en dos monómeros distintos pero de peso molecular semejante, entre 55.000 y 60.000 daltons. El efecto de la colchicina y de los alcaloides de la vinca sobre el aparato mitótico, antes mencionado, se explica porque estos compuestos se unen a las subunidades, cada molécula de colchicina es capaz de ligarse a un dímero de tubulina (Weisenberg 1972), impidiendo que polimericen y originen los microtúbulos. El número y la longitud de los microtúbulos se modifica a lo largo de la mitosis, lo cual viene reflejado en los cambios de birrefringencia que se detectan con el microscopio de polarización; se admite que las modificaciones en la longitud dependen únicamente de la agregación y eliminación de subunidades. Otro componente proteico importante del aparato mitótico es una ATPasa dependiente del magnesio, que en el caso de los microtúbulos de ciclos y flagelos corresponde a la dineína.

Según acabamos de ver, poseemos actualmente abundantes datos en relación a la composición química y a la estructura del aparato mitótico, en cambio, existen todavía grandes lagunas en relación al control de su ciclo de formación-disolución y a los mecanismos de funcionamiento, es decir, al movimiento de los cromosomas durante la división celular.

El aparato mitótico es una estructura de existencia periódica, se forma en la profase, mediante el ensamblado de los microtúbulos y la ordenación de éstos en los diferentes tipos de fibras, y se disuelve en la telofase completamente. El proceso de formación, que es extremadamente rápido, implica una señal que inicie la polimerización de la tubulina y es necesario que esta señal se halle distribuida ordenadamente en el espacio celular, de modo que resulte la estructura característica que hemos descrito. Globalmente la señal podría consistir en una disminución de la concentración de calcio en el citoplasma fundamental, ya que este ión bivalente inhibe la polimerización de la tubulina y hay evidencias de un sistema vesicular secuestrador de calcio, activo durante la fase de formación del aparato mitótico (Rebhun 1977).

En cuanto a la ordenación espacial del proceso de polimerización de la tubulina, los cinetocoros cromosómicos y los cinetocentros de los polos del huso no sólo se comportan como lugares de donde proceden las fuerzas que orientan las fibras del aparato mitótico, sino como verdaderos puntos de formación de las mismas (Grundmann 1967). El papel de estos centros organizadores de microtúbulos (COMTs) en relación al control del ciclo celular podría ser, según Lloyd (1979 a y b), de gran importancia. El concepto de COMT, según el mismo autor, comprende todos los centros organizadores celulares, tanto si actúan en la ordenación de los microtúbulos del aparato mitótico como si lo hacen con respecto a estructuras no relacionadas directamente con la división celular. Por tanto, quedan incluidos los cinetocoros cromosómicos, los centriolos, los corpúsculos basales de cílios y flagelos y también estructuras de menor grado de diferenciación morfológica, COMTs amorfos, que en las plantas y en las levaduras serían funcionalmente equivalentes a los centriolos

de las células animales.

Los microtúbulos del citoesqueleto interfásico y los del aparato mitótico polimerizan alternativamente a lo largo del ciclo celular eucariota. En la profase desaparecen los microtúbulos citoplasmáticos que forman parte del citoesqueleto, con lo cual, si no hay cubiertas rígidas extracelulares, la célula pierde su forma interfásica propia y adopta la forma esférica. Aunque los microtúbulos pueden formarse in vitro por autoensamblado, tanto los microtúbulos del citoesqueleto como los del aparato mitótico se observan, in vivo, como prolongaciones de cuerpos amorfos electrodensos, que constituirían la base fundamental de los COMTs. Este material amorfo puede presentarse como tal (COMTs amorfos), o bien, relacionado con otras estructuras más ordenadas como los centriolos.

El papel exacto del centriolo en la división de las células animales, a diferencia de su papel en la formación de cilios y flagelos (cuerpo basal), es incierto. Existe, sin embargo, una continuidad evolutiva entre los cuerpos basales y los centriolos del aparato mitótico. Los cuerpos basales aislados del alga verde Chlamydomonas se comportan como centriolos del aparato mitótico, si son inyectados en huevos no fertilizados de sapo (Heidemann, Sander y Kirschner 1977). Estos mismos autores han encontrado que este fenómeno es inhibido por el tratamiento de los cuerpos basales con RNA-asa, lo cual sugiere que el RNA es necesario para la actividad organizadora de los COMTs. La idea de que la transformación de los centriolos en cilios podía tener un papel en el control de la división celular es de finales del siglo pasado (ver Lloyd 1979 b). Este tema ha sido revisado por Rash et als. (1966), quienes estudiando la diferenciación celular en el corazón, opinan que "el bloqueo de la mitosis usualmente asociado con la iniciación de la citodiferenciación puede ser correlacionado con la formación de cilios y podría estar mediado por la transformación de los centriolos mitóticos en cuerpos basales de cilios". Lloyd (1979 b) cita otros ejemplos parecidos, no se trata de cilios típicos sino de los denominados cilios internos o primarios, que se forman a partir del centriolo y que carecen de microtú-

bulos centrales. Tucker, Pardee y Fujiwara (1979) han descrito un patrón temporal de ciliación y desciliación del centriolo en fibroblastos 3T3 y sugieren una correlación entre el ciclo celular y el ciclo centriolar: La ciliación tiene lugar cuando las células están detenidas en G0 y cuando son estimulados a proliferar mediante adición de suero fresco, el centriolo inicia la desciliación, vuelve a ciliar durante las 6-8 horas siguientes y descilia de nuevo entre las 12 y las 24 horas, coincidiendo aproximadamente con la síntesis de DNA.

Resumiendo, los COMTs tendrían dos actividades alternativas, la formación de cilios (primarios o típicos) y la formación del aparato mitótico; la duplicación del centriolo y la desviación de su actividad hacia la "alternativa mitótica" ocurriría en el G1 tardío o al comienzo del intervalo S : Así, por ejemplo, en células HeLa sincronizadas el centriolo se duplica en la frontera G1/S (Robbins, Jentsch y Micali 1968). La relación entre la "activación mitótica de los COMTs" y la iniciación de la síntesis de DNA puede ser incluso más estrecha, así en las levaduras, la duplicación del cuerpo polar del huso ocurre en G1 tardío y cuando dicho proceso se halla bloqueado (mutantes termosensibles a la temperatura restrictiva) la iniciación de la síntesis de DNA tampoco tiene lugar (Hartwell 1974). De todo lo anterior puede concluirse, según Lloyd (1979 b), que los organismos pluricelulares podrían ser considerados como "flagelados diferenciados" que sufren metamorfosis al estado reproductivo mediante señales que afectan a los COMTs.

Terminaremos el apartado del aparato mitótico con la exposición de su funcionamiento, es decir, el mecanismo del movimiento cromosómico en la cariocinesis. Este proceso puede dividirse en tres partes :

- 1ª - Incorporación de los cromosomas al aparato mitótico y formación de la placa metafásica.
- 2ª - Estado de equilibrio metafásico.
- 3ª - Separación anafásica de los cromosomas.

En la primera fase, que suele coincidir con la desintegración de la envoltura nuclear, se establecen las conexiones entre los polos y los

cinetocoros cromosómicos. Según hemos mencionado anteriormente, ambos extremos intervienen activamente actuando como centros organizadores de microtúbulos, pero se desconoce de qué modo dichos centros promueven localmente el ensamblado de las subunidades de tubulina. Una vez situados los cromosomas en la placa metafásica se mantienen por algún tiempo en esta situación, que se considera un estado de equilibrio entre las fuerzas que tiran de los cromosomas hacia los polos y la resistencia de las cromátidas a separarse.

La rotura del equilibrio de fuerzas, que determina la iniciación de la anafase, es debida probablemente a la duplicación de la región cromosómica del centrómero, a nivel del cual ambas cromátidas permanecen unidas hasta este momento.

Dos tipos de movimiento están implicados en la separación de los cromosomas: El acercamiento cromosoma-polo debido al acortamiento de las fibras cromosómicas del huso y la separación interpolar, que depende de la expansión de las fibras continuas. El movimiento de los cromosomas se caracteriza por ser rectilíneo y de velocidad constante o decreciente, pero nunca acelerado; esto último es importante porque descarta todas las hipótesis explicativas del movimiento cromosómico basadas en una atracción polar, que impliquen una fuerza de atracción inversamente proporcional al cuadrado de la distancia. Otra característica importante es que los cromosomas se mueven "individualmente", en efecto, aunque usualmente los cromosomas se mueven en grupo, en circunstancias especiales pueden no hacerlo, lo cual indica que cada cromosoma está ligado individualmente al polo correspondiente. Begg y Ellis (1974), utilizando un micromanipulador piezoeléctrico, han confirmado este supuesto comprobando además que la ligadura entre cada cromosoma y el polo es debida a una fibra flexible e inextensible.

Aun cuando la estructura y la composición química del aparato mitótico son relativamente bien conocidas, no existe acuerdo sobre la forma de interpretar el movimiento anafásico de los cromosomas, cuyas características hemos expuesto. Existen al respecto tres hipótesis que se dife-

rencian por la fuente de la fuerza motriz para la separación de las cromátidas :

- Hipótesis del sistema actina-miosina
- Hipótesis del deslizamiento microtubular
- Hipótesis del ensamblado-desensamblado de los microtúbulos

La hipótesis del sistema actina-miosina, sostenida por Forer (1974), admite que la fuerza para el movimiento cromosómico proviene de un sistema microfibrilar actina-miosina, en el que los microtúbulos desempeñan únicamente un papel auxiliar como puntos de apoyo y como amortiguadores del movimiento. Forer basa su hipótesis en la presencia de actina y miosina en el aparato mitótico y en que dicho sistema parece estar relacionado con la mayoría de movimientos celulares. Sostiene Forer, que el hecho de que la destrucción de los microtúbulos con la colchicina impida los movimientos cromosómicos no es una prueba de que la fuerza motriz provenga de los microtúbulos, sino simplemente de que son necesarios para el movimiento. El papel que dicho autor atribuye a los microtúbulos del aparato mitótico es el de puntos de anclaje de los filamentos de actina, guías para los cromosomas y amortiguadores del movimiento. Este último aspecto se basa en una interpretación distinta de la de Inoué (ver más adelante) del desensamblado polar de los microtúbulos (Inoué y Kiehart 1978). Según Forer, la velocidad de desensamblado de los microtúbulos en los polos del huso es el factor limitante de la velocidad del movimiento cromosómico pero no el origen de la fuerza motriz. Esta última correspondería a un sistema actina-miosina, sin embargo, razona Forer, la fuerza desarrollada por un sólo par de filamentos actina-miosina trabajando uno contra otro es unas 3000 veces superior a la necesaria para separar todos los cromosomas de una célula, de lo cual se deduce que debe existir algún factor de resistencia adicional. Este factor consistiría en los microtúbulos que unen cada cromosoma al polo correspondiente, ya que el acercamiento entre ambos implicaría necesariamente su acortamiento. De esta forma el desensamblado polar de los microtúbulos intervendría en el control de la velocidad de separación de los cromosomas.

La hipótesis de Forer tiene, sin embargo, un dato experimental de cierta importancia en contra : Se trata de los experimentos de Inoué y Kiehart (1978) con huevos de estrella de mar, a los que tratan con anticuerpos antimiosina. Este tipo de tratamiento debería bloquear todos los movimientos celulares basados en la interacción actina-miosina y, en efecto, esto es lo que ocurre con la citocinesis o división citoplasmática, pero no con la cariocinesis. Según estos resultados, la interacción actina-miosina no estaría implicada en los movimientos cromosómicos de la anafase.

La hipótesis del deslizamiento microtubular propuesta por McIntosh, Hepler y Van Wie (1969) fundamenta la separación anafásica de los cromosomas en un mecanismo de deslizamiento intertubular semejante al del movimiento de cilios y flagelos. Aunque la dineína o una ATPasa semejante podría estar implicada en el movimiento anafásico, igual que en cilios y flagelos, la hipótesis de McIntosh no parece suficiente para explicar por completo los movimientos (Inoué y Kiehart 1978); sin embargo, la hipótesis del deslizamiento de los microtúbulos combinada con la del ensamblado-desensamblado (Inoué 1959 e Inoué y Kiehart 1978) ha permitido a Margolis construir un modelo muy detallado, que explica satisfactoriamente el proceso (Margolis 1978 y Margolis, Wilson y Kiefer 1978).

La hipótesis del ensamblado-desensamblado de Inoué (Inoué y Kiehart 1978) se basa en los estudios realizados por dicho autor sobre la birrefringencia del huso y, en especial, los efectos sobre la misma del cambio de temperatura, que le permitieron llegar a concebir el aparato mitótico como una estructura resultante de un equilibrio termosensible de los procesos de ensamblado y desensamblado de los monómeros de tubulina. Según Inoué, el movimiento anafásico se produciría como consecuencia de una reducción local en la cantidad de material ordenado en los polos del huso (desensamblado polar) que determinaría un acortamiento de las fibras cromosómicas del aparato mitótico.

La hipótesis del ensamblado-desensamblado incorpora el concepto del equilibrio lábil de la organización microtubular y atribuye la capacidad

de producir fuerza al crecimiento y decrecimiento de los microtúbulos. Argumentando a favor de su hipótesis, Inoué y Kiehart (1978) muestran como la birrefringencia de las fibras del huso in vivo es una buena medida de la densidad de empaquetamiento microtubular y como a mitad que las fibras se acortan, su birrefringencia decrece hacia los polos del huso, mientras que permanece relativamente alta a nivel de los cinetocoros. Además, la velocidad del movimiento es proporcional a la pérdida de birrefringencia, es decir, al desensamblamiento microtubular. Estas observaciones, junto a otras que aportan los autores en el mismo trabajo, soportan la hipótesis de que el desensamblado de los microtúbulos puede estar implicado en la producción del movimiento anafásico de los cromosomas.

Según hemos mencionado más arriba, Margolis ha desarrollado un modelo, que englobando las hipótesis del deslizamiento microtubular y la del ensamblado-desensamblado consigue dar una interpretación bastante convincente de los movimientos cromosómicos durante la mitosis. Según este modelo, los movimientos cromosómicos son la consecuencia de dos tipos de procesos :

1º- Deslizamiento hacia los polos de microtúbulos antiparalelos.

2º- Ensamblado-desensamblado de los microtúbulos en extremos opuestos.

El modelo se basa principalmente en otro trabajo del mismo grupo (Margolis y Wilson 1978), en el que estudian el ensamblado-desensamblado de microtúbulos de cerebro bovino in vitro y demuestran que el estado de equilibrio entre los procesos de ensamblado y desensamblado es realmente un estado estacionario, producto del balance neutro de dos reacciones distintas, que ocurren en los extremos opuestos del microtúbulo. In vitro, la reacción de ensamblado es fuertemente favorecida en un extremo y el desensamblado en el otro, asumiendo los autores, que un mecanismo similar puede considerarse operativo in vivo.

Otro puntal del modelo de Margolis es el hecho de que los anticuerpos contra la dineína bloquean los movimientos anafásicos (Sakai et als. 1976). La dineína es una ATPasa asociada a los microtúbulos, que inter-

viene en el movimiento de cilios y flafelos (De Robertis, Sáez y De Robertis 1977). Ya que estos movimientos se explican actualmente por un mecanismo de deslizamiento microtubular, el hecho de que la dineína esté también implicada en el funcionamiento del aparato mitótico permite suponer también en este caso la intervención de un mecanismo de deslizamiento.

En un ensayo con aparatos mitóticos aislados de erizo de mar, Sakai (1978) muestra como el vanadato, un inhibidor de la actividad ATPasa de la dineína, suprime completamente los movimientos cromosómicos. Además, a la concentración de vanadato utilizada (de 10 a 30 microM), la actividad ATPasa de la miosina no se altera, lo cual constituye otro dato en contra de la hipótesis del sistema actina-miosina, al que antes hemos hecho referencia.

En el modelo de Margolis se asume, esencialmente, lo siguiente :

El huso se halla formado por microtúbulos interpolares y por microtúbulos cinetocoro-polares o cromosómicos. Los microtúbulos interpolares se originan en o cerca del polo correspondiente y atraviesan el huso en mayor o menor extensión, pero sin unirse a un cinetocoro ni al polo opuesto. Los microtúbulos que provienen de un mismo polo son paralelos, es decir, están orientados en el mismo sentido y constituyen un semihuso. Los microtúbulos interpolares de un semihuso son antiparalelos con respecto a los del otro semihuso, con los cuales se interdigitan en el ecuador del huso. Entre los microtúbulos paralelos, interpolares y cromosómicos, pueden establecerse uniones no deslizantes. Todos los microtúbulos se ensamblan y desensamblan constantemente en los extremos opuestos, esto es, ensamblado ecuatorial o distal y desensamblado polar.

Un mecanismo de deslizamiento entre los microtúbulos interpolares antiparalelos interviene constantemente para separar los dos semihusos, que tienden a converger en la región ecuatorial por incorporación continua de subunidades. Debido al ensamblado-desensamblado y al deslizamiento antiparalelo se establece una "cinta transportadora" de subunidades, que se mueve constantemente hacia el polo correspondiente. Este desliza-

miento en dirección polar ejerce una fuerza contra la unión de las cromátidas, dando lugar, en la metafase, a un estado de tensión isométrica, que se transforma en trabajo de transporte cuando se desacoplan las cromátidas en la anafase. Los mecanismos de ensamblado-desensamblado, de deslizamiento antiparalelo de los microtúbulos y de uniones paralelas no deslizantes originan un orgánulo celular, el aparato mitótico, cuya integridad estructural es mantenida por la oposición de fuerzas en un estado de tensión dinámica.

El modelo de Margolis, esquemáticamente representado en la figura 15, explica satisfactoriamente todas las fases de la cariocinesis: En la profase, la separación de los dos polos puede entenderse como una consecuencia de un predominio del ensamblado sobre el desensamblado, de modo que el crecimiento neto de los microtúbulos unido al deslizamiento antiparalelo en la región de convergencia de los dos semihusos determina el distanciamiento interpolar.

En la prometafase, aparecen los microtúbulos cromosómicos, bien como resultado del ensamblado microtubular a nivel de los cinetocoros, o bien, por la unión de algunos microtúbulos interpolares a los cinetocoros. En cualquier caso, los microtúbulos cinetocoro-polares establecen uniones no deslizantes con los microtúbulos interpolares del mismo semihuso. Por otra parte, el modelo permite predecir que mientras las cromátidas se mantengan unidas por el centrómero, el sistema mantendrá la posición ecuatorial de los cromosomas: En efecto, si un cromosoma se desplaza hacia uno de los polos, los microtúbulos cromosómicos del lado correspondiente al polo más alejado interaccionarán con los microtúbulos interpolares del semihuso opuesto y se producirá el deslizamiento que reconducirá al cromosoma al punto de equilibrio (figura 15, A).

En la metafase, no ocurrirá ningún movimiento neto ya que el ensamblado-desensamblado microtubular está exactamente balanceado por la velocidad de deslizamiento polar entre los dos semihusos. Por lo que respecta a los microtúbulos cromosómicos, participan en este sistema de fuerzas mediante uniones no deslizantes con los microtúbulos antiparale-

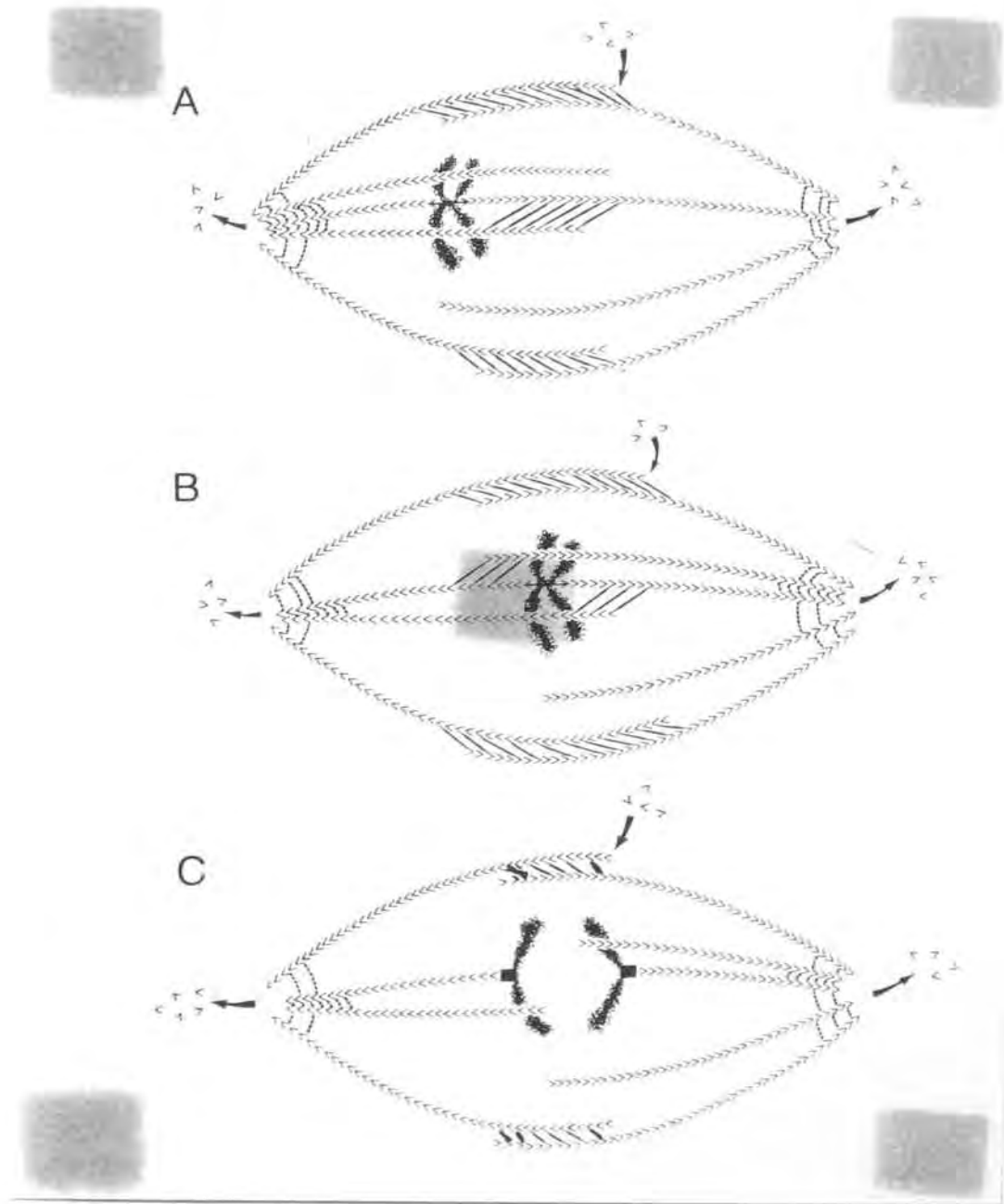


Figura 15 : Representación esquemática del mecanismo mitótico propuesto por Margolis. La interacción antiparalela de microtúbulos se indica mediante $////$ y la unión paralela no deslizante por $\bullet\bullet\bullet\bullet$. Ver explicación en el texto. (Tomado de Margolis 1978)

los del semihuso opuesto, resultando una tensión polar sobre el cromosoma metafásico (figura 15, B).

En la anafase, la rotura de la unión entre las dos cromátidas de cada cromosoma debida a la duplicación del centrómero permite la transformación de esta tensión en trabajo de transporte de las cromátidas a los polos respectivos. En la separación de los dos grupos de cromosomas, el modelo de Margolis admite la participación de dos factores : La separación de los polos por el deslizamiento antiparalelo de los microtúbulos interpolares, que es un proceso dependiente del ATP, y el cese del ensamblado de los microtúbulos cromosómicos a nivel del cinetocoro, con el consiguiente acortamiento de la distancia cromosoma-polo, con velocidad proporcional a la del desensamblado polar (figura 15, C).

2.5.4 La citocinesis o división citoplasmática

Análogamente al término cariocinesis, que designa los movimientos del núcleo y de los cromosomas durante la división celular, el término citocinesis significa el conjunto de cambios de forma del citoplasma que tienen lugar durante dicho proceso y, más específicamente, los mecanismos de bipartición del citoplasma o clivaje celular. En este sentido más restringido, la citocinesis empieza al final de la cariocinesis, desarrollándose de manera distinta según se trate de células con o sin paredes rígidas. En este último caso, que es el de las células animales, la citocinesis consiste esencialmente en la depresión de la superficie celular en la región del plano ecuatorial del huso. Se forma, por tanto, un surco anular que se hace progresivamente más profundo, hasta la completa bipartición de la célula.

En células con paredes rígidas (vegetales), la citocinesis no conlleva deformación de la superficie, sino la formación en el plano ecuatorial del huso de un agregado de microtúbulos y de vesículas del aparato de Golgi, que se conoce con el nombre de fragmoplasto. Posteriormente se produce la fusión de las vesículas de este agregado, constituyéndose la membrana de cada célula y quedando en el espacio intercelular

el material de secreción contenido en las vesículas. Este material, que está constituido fundamentalmente por pectina, da lugar a la pared celular primaria, que se transforma en la pared definitiva por depósito de la celulosa elaborada y segregada por ambas células.

Para el estudio de la citocinesis en células animales se han utilizado preferentemente cultivos celulares y huevos en fase de segmentación. Por sus favorables características, el huevo de erizo de mar ha constituido un material muy común para el análisis de la división celular, y muchas evidencias experimentales acerca de los mecanismos de la citocinesis provienen de trabajos realizados en dicho material.

En la actualidad, la citocinesis se concibe como un caso particular dentro del grupo de movimientos celulares basados en contracciones de la corteza celular. Mediante diferentes aproximaciones experimentales (bioquímica, inmunofluorescencia, microscopía electrónica) ha sido posible demostrar la existencia de filamentos de actina o de proteínas muy semejantes en diversos tipos celulares y, también, aunque en menor medida la presencia de proteínas con actividad ATPasa semejantes a la miosina (ver De Robertis, Sáez y De Robertis 1977). Estos hallazgos permiten suponer la existencia de sistemas actina-miosina, semejantes al del músculo esquelético, pero con menor grado de ordenación, en la corteza de la mayoría de células. Dichos sistemas contráctiles permitirían explicar la citocinesis, la endo y la exocitosis, el ameboidismo etc. Otra razón por la que debe considerarse a la citocinesis muy relacionada con los demás movimientos contráctiles de la corteza celular es que la droga citocalasina B inhibe todos estos movimientos, incluyendo la citocinesis (Allison 1973). No se conoce cual es el fundamento molecular de este efecto de la citocalasina B, pero se sabe que altera la ordenación de los microfilamentos. Hasta cierto punto, sería una situación comparable a la de la colchicina en relación a los sistemas microtubulares.

La contracción anular de la corteza celular no es, con mucho, el único con mucho, el único cambio observable en la superficie celular durante la mitosis. Ocurren, en efecto, otros cambios importantes, aunque

su relación con la citocinesis propiamente dicha no es conocida. En cultivos celulares en monocapa, el cambio más directamente observable es el redondeamiento de la célula. En la interfase, las células permanecen pegadas a la pared del frasco de cultivo hallándose más o menos aplanadas. La iniciación de la mitosis conlleva un despegamiento parcial de las células, que adoptan una forma prácticamente esférica. Esta pérdida de la adherencia de las células al sustrato constituye el fundamento de la técnica de selección mitótica, que hemos considerado en relación a los métodos de sincronización celular. El cambio de forma de la célula en la transición G2/M, que es extremadamente rápido, tiene lugar en unos pocos segundos, va acompañado de un burbujeo de la superficie celular durante la anafase (Tobey, Petersen y Anderson 1971).

Además de estos cambios morfológicos, se han comprobado diversas modificaciones de las propiedades físicoquímicas de la superficie celular. Según las revisiones de Tobey, Petersen y Anderson (1971), Prescott (1976) y Baserga (1976), las más notables son las siguientes :

Un aumento de la densidad de carga eléctrica negativa, que determina la mayor movilidad electroforética de las células en mitosis y que se supone debida a los grupos carboxílicos de los residuos de ácido siálico. Ya que la cantidad de ácido siálico por unidad de superficie no aumenta realmente, la única explicación posible de este cambio es el de una modificación en la disposición de los sialopéptidos y los sialolípidos en la membrana, que conllevaría una mayor exposición al exterior de las cargas negativas.

Otro cambio que se produce regularmente es el aumento de afinidad por las lectinas vegetales, como la concanavalina A, que hace que las células mitóticas sean aglutinables por lectinas, mientras que no lo son las células interfásicas. Esta propiedad es especialmente interesante, ya que las células transformadas o neoplásicas, a diferencia de las normales, mantienen este estado de alta afinidad por las lectinas a lo largo de todo el ciclo. Además se ha comprobado (Sachs 1974) que existe una proporcionalidad directa entre el grado de malignidad y el grado de aglu-

tinabilidad por lectinas en la interfase. Es natural, por tanto, que se admita una relación entre este cambio de la superficie celular y el control de la mitosis.

Finalmente, es obligado considerar las relaciones entre la cariocinesis y la citocinesis. Generalmente ambos procesos están estrictamente coordinados, pero en ciertos casos, se presentan disociados. Esto ocurre, a veces, de forma regular, es el caso del mixomiceto Physarum plycephalum, en el que la citocinesis no ocurre en absoluto y la célula crece como un plasmodio, es decir, un sólo compartimento citoplasmático en el que pueden hallarse miles de núcleos (Prescott 1976). Otro caso, es el de los huevos de insecto, que en la primera fase del desarrollo lo hacen como plasmodios y posteriormente tiene lugar la segmentación del citoplasma (Balinsky 1965). Algo parecido ocurre en los procesos de esporogénesis vegetal y en la división múltiple simultánea de los tripanosomas (Grundmann 1967).

En los mamíferos, adultos, existen también ejemplos de células multinucleadas por disociación entre cario y citocinesis. Por ejemplo, los megacariocitos de la médula ósea, los hepatocitos binucleados, algunos tipos celulares histiocitarios de procesos inflamatorios y también, con cierta frecuencia, las células de los tumores, especialmente en las neoplasias malignas que suelen presentar anomalías mitóticas (Hamperl 1967).

En cuanto al fundamento de la coordinación entre cariocinesis y citocinesis, existen bastantes datos experimentales que favorecen la hipótesis de que se halla implicado un mecanismo de transporte de calcio. Rebhun (1977) ha revisado este problema :

Por un lado, aporta datos de trabajos propios y de otros autores que demuestran que el ión calcio inhibe la polimerización de la tubulina e, incluso, es capaz de provocar el desensamblado de los microtúbulos del aparato mitótico cuando su concentración alcanza valores del orden de 50-100 microM. Aporta también evidencias de la existencia en el aparato mitótico de un sistema microvesicular secuestrador de calcio (Kinoshita y Yazaki 1967) y de una ATPasa calcio-dependiente (Mazia et als. 1972),

cuya actividad aumenta durante la profase, alcanza el máximo en la metafase y decrece durante la telofase. Rebhun sugiere que esta ATPasa podría formar parte de las vesículas de Kinoshita, las cuales actuarían de una forma semejante al retículo sarcoplasmático, es decir, utilizando la hidrólisis del ATP como fuente de energía, bombearían el calcio del hialoplasma hacia el espacio intravesicular. La activación de este sistema en la profase bajaría la concentración de calcio en el hialoplasma hasta valores suficientemente bajos para permitir el ensamblado de los monómeros de tubulina y, por tanto, la formación del aparato mitótico.

Por otra parte, está también demostrado que la citocinesis es un proceso dependiente de calcio. Así, por ejemplo, Timourian et als. (1972) han conseguido inhibir la segmentación en huevos de erizo de mar, depositando, mediante micropipeta, EDTA en el surco de clivaje. Esta dependencia no es sorprendente si se tiene en cuenta que la contracción cortical responsable de la citocinesis se basa en un sistema semejante al de la actina-miosina muscular. Apoyándose en las anteriores consideraciones, Rebhun (1977) propone el siguiente modelo :

La coordinación entre cariocinesis y citocinesis implicaría cambios de distribución y de actividad de un sistema secuestrador de calcio (las vesículas de Kinoshita). Dicho sistema actuaría en la profase en el endoplasma, en el sentido de reducir la concentración de calcio permitiendo o desencadenando la formación del aparato mitótico. En la telofase este sistema se situaría en el ectoplasma o corteza celular, donde liberaría el calcio, provocando la activación del sistema contráctil cortical que interviene en la citocinesis. En cuanto al desplazamiento del sistema vesicular secuestrador de calcio del endo al ectoplasma podría estar relacionado con los cambios de organización del citoesqueleto y de la viscosidad del citoplasma fundamental que se producen como consecuencia de la formación del aparato mitótico.

2.6 La reproducción celular durante el desarrollo. Caso del hígado de los vertebrados.

2.6.1 Cinética de crecimiento

Durante el desarrollo de un organismo pluricelular, crecimiento, diferenciación y movimientos morfogenéticos tienen lugar de forma coordinada hacia el establecimiento de un patrón característico de tipos celulares, tejidos y órganos estructural y funcionalmente integrados. El organismo adulto se halla en un estado estacionario, de modo que mantiene constante su composición a través de un recambio molecular y celular continuos. Existen mecanismos homeostáticos que mantienen invariantes las diversas características del sistema pluricelular y cuando las constantes del mismo son alteradas artificialmente puede observarse una reacción del sistema en el sentido de recuperar la posición del estado estacionario.

A nivel pluricelular, el crecimiento resulta esencialmente de la reproducción celular y, en menor medida, del crecimiento celular sin reproducción y de la acumulación de materiales intercelulares. Por tanto, cualquier análisis del crecimiento de un organismo pluricelular debe basarse en la cinética de población celular.

El estudio del crecimiento puede abordarse a dos niveles : un nivel "macroscópico" en el que se describe la variación en el tiempo de magnitudes globales como el volumen, el peso o el número de células y se trata de encontrar una descripción matemática del proceso y un nivel "microscópico" en el que interesa el análisis del proceso en términos de cinética de población, esto es, de reproducción, diferenciación y recambio celulares.

Para la medida del crecimiento se utiliza comunmente el peso del órgano, organismo o tumor, aunque para estos últimos se utiliza también el volumen en estudios longitudinales de un tumor in situ (Steel 1977). Para órganos embrionarios de las primeras fases del desarrollo, en los

que resulta difícil el aislamiento, se utiliza también la volumetría a partir de mediciones de superficie de sección en cortes histológicos de espesor conocido (Schmalhausen 1926 y Goedbloed 1972). Otros autores utilizan para órganos embrionarios la cantidad de DNA/órgano en lugar del peso o del volumen del mismo (Enesco y Leblond 1962 y nosotros mismos en esta tesis). La ventaja de medir DNA/órgano consiste en que esta magnitud está directamente relacionada con el número de células, ya que, a diferencia del peso y el volumen, no está influenciada por las variaciones del tamaño celular o de los materiales intercelulares.

En las ecuaciones de crecimiento utilizamos el símbolo "P" para designar el tamaño, aunque esto no significa que deba tratarse del peso, sino cualquier forma de medir el tamaño tridimensional (peso, volumen, cantidad de DNA). En cambio, las medidas lineales (diámetros, alturas) no pueden tomarse directamente como medida del tamaño (P), pero pueden convertirse en volúmenes si la geometría del sistema es sencilla.

El crecimiento biológico, basado en la reproducción celular, es un proceso de carácter exponencial modulado o autolimitado. En sus primeras fases, el crecimiento de un embrión puede describirse por la ecuación de crecimiento

$$P = P_0 \cdot e^{k \cdot t} \quad (39)$$

O en forma de ecuación de velocidad

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot P \quad (40)$$

Siendo la velocidad específica

$$k = \frac{1}{P} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (41)$$

Sin embargo, a medida que progresa el desarrollo la velocidad específica (k) no se mantiene constante, sino que va disminuyendo. Esta

amortiguación o modulación de la velocidad específica es característica de los procesos de crecimiento y obedece a diversos factores autolimitantes del proceso. La velocidad específica puede calcularse para un lapso de tiempo determinado, a partir de los logaritmos de P según la expresión

$$k = \frac{\ln P - \ln P_0}{\Delta t} \quad (42)$$

que se obtiene tomando logaritmos en la 39.

Las curvas de crecimiento de muchos organismos y en especial de aves y mamíferos, así como las de los procesos de regeneración de órganos y del crecimiento de tumores son de tipo sigmoide (Balinsky 1978, Brody 1945, Büchner 1955 y 1969, Schmalhausen 1926 y Steel 1977). Una curva sigmoide tiene dos partes que se unen en el punto de inflexión: en la primera parte, la velocidad absoluta del proceso aumenta debido al incremento de la masa creciente (P) y, a pesar, de la disminución progresiva de la velocidad específica. A partir del punto de inflexión, la velocidad absoluta empieza a disminuir, ya que el incremento de P no compensa la disminución de la velocidad específica. A medida que las velocidades específica y absoluta se aproximan a 0, el tamaño de la masa creciente tiende asintóticamente a un límite característico (A). Aunque teóricamente este tamaño límite se alcanza se alcanza en el infinito, existe para los organismos un tamaño adulto característico, ya que a partir de cierto tiempo el crecimiento es demasiado pequeño para ser detectado.

En algunos reptiles y peces, la modulación del crecimiento es distinta, ya que si bien se observa una atenuación progresiva de la velocidad del proceso, no existe un tamaño adulto característico. En efecto, algunos peces y reptiles alcanzan tamaños extraordinarios si viven el tiempo suficiente. En estos animales la curva de crecimiento es de tipo parabólico (Schmalhausen 1927 y 1930a).

En los insectos holometábolos, el crecimiento es exponencial entre

las mudas y prácticamente se detiene de forma brusca durante las mudas, por lo que la curva de crecimiento está constituida por una serie de crecimientos exponenciales con lapsos de crecimiento cero intercalados. Aunque, a primera vista, este tipo de crecimiento puede parecer muy distinto del crecimiento sigmoide, en realidad no lo es tanto, pues algunos autores han llegado a la conclusión de que el crecimiento a grosso modo continuo y sigmoide de aves y mamíferos puede describirse más exactamente por medio de una curva discontinua constituida por una serie de exponenciales con velocidad específica decreciente de una a otra (Brody 1945 y Goedbloed 1972, 1974, 1975, 1976 y 1977). Según esta interpretación, la curva globalmente sigmoide está formada por segmentos relativamente largos, durante los cuales el crecimiento es exponencial, es decir, con velocidad específica constante y la transición de un segmento a otro se hace de forma discontinua, mediante un cambio brusco en la constante de velocidad (k).

El problema de desarrollar una expresión matemática que describa el crecimiento autolimitado y especialmente las curvas sigmoides no consiste tanto en encontrar una ecuación que se ajuste a los datos de observación, como en tratar de conseguir una función, cuyos parámetros y relaciones tengan una interpretación biológica clara y, naturalmente, ajustable a los datos. De hecho, hay una infinidad de aproximaciones matemáticas posibles que permiten describir una serie concreta de valores experimentales, la flexibilidad de una ecuación y la posibilidad de dar un significado biológico preciso a sus parámetros permitirán escoger las expresiones más adecuadas.

Comentamos a continuación algunas de las aproximaciones más generalmente utilizadas :

Brody (1945) no trata de hallar una única expresión para todo el proceso, sino que lo divide en dos partes y emplea una función distinta para cada una. La primera parte o fase de autoaceleración es descrita mediante una función exponencial, en realidad por una serie de exponenciales cuya velocidad específica (k) es cada vez menor, al pasar de una

función a la siguiente, aunque la velocidad absoluta sigue aumentando. Esta fase se prolonga hasta el punto de inflexión, donde empieza la segunda o fase de autoinhibición, que es descrita por una única función que proviene de la teoría cinética de reacciones monomoleculares :

$$P = \frac{P_0}{1-b} \cdot (1 - b \cdot e^{-k \cdot t}) \quad (43)$$

O en forma de ecuación de velocidad

$$\frac{dP}{dt} = P_0 \cdot \frac{b \cdot k \cdot e^{-k \cdot t}}{1-b} \quad (44)$$

Donde P_0 es el tamaño en el punto de inflexión de la curva de crecimiento completa y "k" y "b" son constantes.

Un estudio detallado de la ecuación monomolecular, así como de las principales funciones de crecimiento puede encontrarse en Defares, Snedon y Wise 1973. A medida que t aumenta, P tiende asintóticamente a $P_0/1-b$, si llamamos a este valor o tamaño adulto "A", las expresiones 43 y 44 pueden escribirse respectivamente :

$$P = A \cdot (1 - b \cdot e^{-k \cdot t}) \quad (45)$$

$$\frac{dP}{dt} = A \cdot b \cdot k \cdot e^{-k \cdot t} \quad (46)$$

Haciendo $A \cdot b = B$, la expresión 45 se transforma en

$$P = A - B \cdot e^{-k \cdot t} \quad (47)$$

que es la directamente utilizada por Brody (1945).

Otra aproximación es la ecuación logística, cuya aplicación al crecimiento es debida a Robertson (1908) y ha sido muy utilizada. La ecuación logística es una función sigmoide :

$$P = P_0 \cdot \frac{1+b}{1+b \cdot e^{-k \cdot t}} \quad (48)$$

y en forma de ecuación de velocidad

$$\frac{dP}{dt} = \frac{(1+b) \cdot b \cdot k \cdot P_0 \cdot e^{-k \cdot t}}{(1+b \cdot e^{-k \cdot t})^2} \quad (49)$$

o bien

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot P \cdot \left(1 - \frac{P}{(1+b) P_0} \right) \quad (50)$$

La ecuación logística tiene el punto de inflexión en

$$P = \frac{P_0(1+b)}{2} \quad t = \frac{\ln b}{k}$$

y el valor asintótico de P (tamaño adulto A) es

$$A = P_0 \cdot (1+b)$$

de manera, que el punto de inflexión se alcanza precisamente cuando P es la mitad del tamaño adulto A.

Utilizando la constante A, en lugar de P_0 , las expresiones 48 y 50 se convierten respectivamente en

$$P = \frac{A}{1+b \cdot e^{-k \cdot t}} \quad (51)$$

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot P \cdot \frac{A-P}{A} \quad (52)$$

Siendo esta última la más ampliamente utilizada como ecuación logística de crecimiento (Balinsky 1978).

Hemos señalado más arriba la importancia de la significación biológica

de las ecuaciones de crecimiento. Respecto a las dos anteriores aproximaciones, tanto la ecuación logística como la monomolecular, según es interpretada por Brody (1945), explican la atenuación de la velocidad de crecimiento por la aproximación de P a un límite A, de modo, que la velocidad específica de crecimiento es función de la diferencia A - P. ¿Cuáles son los "obstáculos" que frenan el crecimiento a medida que P se aproxima al límite A?. Esto es, ¿Cómo mide el sistema pluricelular la diferencia A - P?. ¿Qué clase de señales indican al organismo como un todo, que su tamaño se aproxima a un límite al que ha de llegar pero que no debe ser rebasado?. Finalmente, ¿Qué mecanismos a nivel de la cinética de las poblaciones celulares son responsables de la modificación del ritmo de crecimiento?. No existen respuestas definitivas, aunque los modelos de regulación y el análisis "microscópico" del crecimiento, de los que nos ocuparemos más adelante, proporcionan un marco de posibilidades.

L. von Bertalanffy (1949) propuso una ecuación de crecimiento basada en el balance metabólico :

$$\frac{dP}{dt} = z \cdot P^n - w \cdot P^m \quad (53)$$

Según esta expresión, que no contiene elementos hipotéticos, la velocidad de crecimiento viene dada por la diferencia entre velocidad de síntesis (anabolismo) y velocidad de degradación (catabolismo) de los materiales constituyentes del organismo.

La velocidad de síntesis es igual al producto de la constante anabólica o velocidad específica de síntesis (z) por una determinada potencia del peso (P^n), donde el valor del exponente n depende del tipo metabólico del organismo, es decir, si el metabolismo basal es proporcional a la superficie o al volumen del organismo.

La velocidad de degradación es igual al producto de la constante catabólica o velocidad específica de degradación (w) por una determinada potencia del peso (P^m), pudiéndose tomar el exponente m aproximadamente

igual a la unidad, ya que los estudios fisiológicos indican que la velocidad catabólica es proporcional al peso corporal.

La ecuación de von Bertalanffy es muy flexible y aun fijando $m = 1$ puede describir diferentes tipos de crecimiento, desde crecimientos exponenciales como los de las larvas de los insectos holometábolos, en los que el anabolismo es proporcional al volumen corporal ($n = 1$) a las diferentes formas de curvas sigmoides propias del crecimiento de la mayoría de animales, en los que el anabolismo no es proporcional al volumen, sino más bien a la superficie corporal (n inferior a 1). Además, esta interpretación metabólica del crecimiento no requiere formular hipótesis sobre señales especiales que midan la diferencia entre el tamaño del organismo (P) y el tamaño adulto (A) como en las aproximaciones anteriores, sino que el crecimiento regulado hasta el límite A es simplemente una consecuencia del balance metabólico, dependiendo el valor de A de la combinación de constantes (z, n, w, m) propias de cada especie.

Fabens (1965) ha mostrado que la ecuación diferencial de von Bertalanffy (1949) cuando el exponente del término metabólico es la unidad ($m = 1$) tiene una solución que puede escribirse de la forma

$$P = A \cdot (1 - b \cdot e^{-k \cdot t})^3 \quad (54)$$

O bien

$$P = \frac{P_0}{(1-b)^3} \cdot (1 - b \cdot e^{-k \cdot t})^3 \quad (55)$$

ya que

$$P_0 = A (1-b)^3$$

siendo A el valor asintótico de P para t igual a infinito. El punto de inflexión está localizado a $8/27$ del valor asintótico A .

Otra función muy utilizada para describir el crecimiento sigmoide es la ecuación de Gompertz (Defares, Sneddon y Wise 1973, Krüger 1973 y Steel 1977). Dicha ecuación se adapta aceptablemente no solo al crecimiento de organismos, sino también al de los tumores.

$$P = P_0 \cdot e^{b(1 - e^{-k \cdot t})} \quad (56)$$

O bien, en función del valor asintótico o tamaño adulto A

$$P = A \cdot e^{-b} \cdot e^{-k \cdot t} \quad (57)$$

donde

$$A = P_0 \cdot e^b$$

La correspondiente ecuación de velocidad es

$$\frac{dP}{dt} = A \cdot b \cdot k \cdot e^{-k \cdot t} - b \cdot e^{-k \cdot t} \quad (58)$$

y el punto de inflexión se encuentra en

$$P = P_0 \cdot e^{b-1} = \frac{A}{e} \quad t = \frac{\ln b}{k}$$

La función de Gompertz supone una disminución exponencial de la velocidad específica o lo que es lo mismo un alargamiento exponencial del período de duplicación de la población DT :

$$DT = \frac{\ln 2}{b \cdot k} \cdot e^{k \cdot t} \quad (59)$$

En todas las ecuaciones de crecimiento anteriores aparecen dos tipos de constante de distinta significación. Las constantes $-k-$ con dimensión T^{-1} son constantes de velocidad, mientras que las constantes

- b - son adimensionales y están relacionadas con el tamaño asintótico o adulto (A). Para cada ecuación el valor de A queda determinado por P_0 y b : En la

- Ecuación monomolecular $A = \frac{P_0}{1-b}$

- Ecuación logística $A = P_0 (1+b)$

- Ecuación de von Bertalanffy $A = \frac{P_0}{(1-b)^3}$

- Ecuación de Gompertz $A = P_0 \cdot e^b$

Existen muchas otras ecuaciones capaces de describir los procesos de crecimiento, hemos considerado únicamente las más corrientemente utilizadas. El mejor o peor ajuste de los datos determinará la elección de la ecuación adecuada en cada caso concreto. De todas las ecuaciones revisadas, la de Gompertz es la de utilización más general. Sin embargo, Goedbloed (1972, 1974, 1975, 1976 y 1977), trabajando sobre el crecimiento embrionario y postembrionario de la rata y del ratón, renuncia a la utilización de cualquier función continua, substituyéndola por una serie de exponenciales simples, de modo que la transición de una a otra se realiza bruscamente, esto es, la velocidad específica de crecimiento no disminuye gradualmente, sino que salta a un valor inferior después de un cierto período en que se ha mantenido constante. El autor, apoyado en razonamientos estadísticos sobre el ajuste de datos, concluye que ninguna función continua describe mejor sus datos que la serie de exponenciales.

Un segundo aspecto del análisis "macroscópico" del crecimiento es

el problema del crecimiento relativo de los órganos. El interés del mismo radica en que el crecimiento de un organismo dista mucho de ser un proceso isométrico. Se trata, en realidad, de algo mucho más complicado ya que los diferentes órganos o partes crecen con distintas velocidades y por ello sus proporciones y la forma del organismo van modificándose a lo largo del desarrollo.

Los primeros estudios analíticos sobre crecimiento relativo o diferencial de los órganos son debidos a Huxley (1924 y 1932). A partir del análisis de distintos ejemplos de vertebrados e invertebrados, este autor llegó a una interesante generalización: El crecimiento relativo de un par de órganos o de un órgano con respecto al resto del organismo puede ser descrito durante largos períodos del desarrollo por una función potencial, cuyo exponente constante (K) es la proporción de crecimiento diferencial y equivale a la relación entre las velocidades específicas de crecimiento de los dos órganos:

$$Y = b \cdot X^K \quad (60)$$

Donde Y y X son los tamaños de los dos órganos, K es la proporción de crecimiento diferencial del órgano (y) con respecto al órgano (x) y b es una constante adimensional que numéricamente es igual al valor de Y cuando X = 1.

Es fácil demostrar que esta relación debe cumplirse siempre que el crecimiento de ambos órganos sea exponencial, esto es, de velocidad específica constante:

$$\frac{1}{Y} \cdot \frac{dY}{dt} = K_y \quad \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = K_x$$

Siendo las respectivas ecuaciones de crecimiento

$$Y = Y_0 \cdot e^{K_y \cdot t} \quad (61)$$

$$X = X_0 \cdot e^{K_x \cdot t} \quad (62)$$

Tomando logaritmos en ambas y dividiendo una por otra resulta

$$\frac{\log Y - \log Y_0}{\log X - \log X_0} = \frac{K_y}{K_x} = K \quad (63)$$

quitando logaritmos y transponiendo términos obtenemos

$$Y = \frac{Y_0}{X_0^K} \cdot X^K \quad (64)$$

donde

$$\frac{Y_0}{X_0^K} = b \quad \text{y} \quad \text{si} \quad X_0 = 1, \quad b = |Y_0|$$

Por tanto, el que dicha relación se cumpla para el crecimiento relativo de dos órganos que crecen exponencialmente es algo trivial. Lo interesante del hallazgo de Huxley es que durante el desarrollo las velocidades específicas de crecimiento de los órganos no se mantienen constantes, sino que disminuyen progresivamente, es decir, los crecimientos no son realmente exponenciales sino amortiguados y, por tanto, el cumplimiento de la ecuación 60 no resulta trivial, sino que revela una importante propiedad de los mecanismos de control del crecimiento.

En efecto, lo que la expresión empíricamente hallada por Huxley indica es que partiendo de velocidades específicas de crecimiento iguales o diferentes para un par de órganos en un momento dado, su disminución durante el desarrollo o durante largas etapas del mismo tiene lugar en la misma proporción:

$$\frac{1}{Y} \cdot \frac{d^2 Y}{dt^2} < 0, \quad \frac{1}{X} \cdot \frac{d^2 X}{dt^2} < 0, \quad \frac{1/Y \cdot dY/dt}{1/X \cdot dX/dt} = K$$

En los trabajos citados, Huxley utilizó los términos crecimiento heterogónico y crecimiento isogónico para designar el crecimiento relativo de un par de órganos, según sus velocidades específicas fueran distintas o iguales. Además, si el valor de la proporción de crecimiento diferencial (K) de un órgano respecto del otro o respecto del resto del organismo era superior o inferior a la unidad, dicho órgano era calificado de heterogónico positivo o de heterogónico negativo respectivamente. Posteriormente, esta nomenclatura fue modificada, substituyendo heterogonía por alometría e isogonía por isometría (ver Needham y Lerner 1940). En adelante nos referiremos a la expresión 60 como función o ecuación alométrica.

Los conceptos del crecimiento relativo desarrollados por Huxley para el crecimiento de los órganos fueron aplicados por Needham (1932 y 1934) a la acumulación de componentes químicos del organismo durante el desarrollo. Este último autor acuñó el término heterogonía química, mostró como la relación alométrica se cumplía para diversos componentes como grasa, glucógeno etc. en relación al peso seco y, además, que el valor de la proporción de crecimiento diferencial para un determinado compuesto en relación al peso seco del animal o de un órgano determinado era muy parecido en distintos animales, lo cual le llevó al concepto de que debía existir un plan químico fundamental del crecimiento animal.

Posteriormente, Davidson y Leslie (1950) relacionaron entre sí la acumulación de DNA, RNA, proteínas y lípidos en diversos órganos del embrión de pollo y pudieron comprobar la existencia de las correspondientes relaciones alométricas.

En todos los estudios mencionados sobre crecimiento relativo, la representación de los datos se hace por medio de gráficas bilogarítmicas que transforman la expresión 60 en una recta.

La proporción de crecimiento diferencial en términos de heterogonía química fue interpretada como un coeficiente de partición entre fases, esto es, coeficiente de partición de un determinado componente entre un órgano y otro o entre un órgano y el resto del organismo (Needham 1934).

Esta interpretación es excesivamente simplificadora, ya que la acumulación diferencial de sustancias químicas en un organismo en desarrollo no es solamente un problema de diferencias de fijación de sustancias circulantes en diversas partes, sino también de distintas capacidades biosintéticas de los distintos órganos.

2.6.2 Cinética proliferativa y diferenciación celular

La primera pregunta que puede hacerse al observar una curva de crecimiento ponderal es ¿ En qué medida la curva representa realmente un aumento en el número de células ?. Enesco y Leblond (1962) abordaron esta cuestión en el caso del crecimiento de la rata, durante los últimos 8 días del desarrollo embrionario y los primeros tres meses de vida postnatal. Los autores midieron el peso total y de diversos órganos y, además, determinaron la cantidad de DNA correspondiente. Conociendo la cantidad de DNA/núcleo característica de la especie pudieron representar el crecimiento de los órganos en forma de número de núcleos en función del tiempo, es decir, medir el aumento del número de células y compararlo con el incremento ponderal. El peso de un órgano dividido por el número de núcleos correspondiente (peso por núcleo) fué utilizado por los autores como medida del tamaño celular y del material extracelular. Cuando el peso/núcleo variaba, la observación microscópica permitía valorar la importancia relativa de los dos factores.

Las principales conclusiones del trabajo de Enesco y Leblond (1962) son las siguientes :

En la mayor parte de los órganos (páncreas, testículo, riñón, suprarrenal, hígado etc.) el número de núcleos aumenta con la edad mucho más que el peso/núcleo, es decir, la proliferación celular es el componente fundamental del crecimiento. En el timo, como caso extremo, durante los tres primeros meses de vida el incremento de peso es atribuible exclusivamente al aumento del número de células.

El aumento de peso/núcleo tiene lugar, para la mayor parte de órganos, después del nacimiento, especialmente entre los días 17 y 48,

coincidiendo con un enlentecimiento importante del crecimiento. Excepto en la piel, donde hay un aumento importante del material extracelular (fibras colágenas), en los demás órganos el aumento del peso/núcleo es debido casi exclusivamente al aumento del tamaño celular. Este aumento es muy pequeño en órganos constituidos por poblaciones celulares de recambio (timo, tracto digestivo, testículo) y moderado en aquellos constituidos por poblaciones expansivas (hígado, páncreas, riñón etc.).

La clasificación cinética de las poblaciones celulares en estáticas, expansivas y de recambio, introducida ya en el apartado 2.1.2 de esta tesis, fué ideada por Messier y Leblond (1960) y marca el comienzo de la teoría cinética de poblaciones celulares, que se desarrolló durante los años 60 y 70 gracias principalmente a las técnicas de acumulación mitótica con bloqueantes y de marcado con timidina tritiada.

En los libros de Steel (1977) y de Aherne et al. (1977) puede encontrarse un tratamiento analítico detallado de la cinética de poblaciones celulares, con ejemplos tanto de tejidos normales como neoplásicos. La breve revisión de Leblond (1972) es una aproximación más elemental y empírica dedicada básicamente al problema de la clasificación de las poblaciones, con aplicación concreta a diversos tejidos normales.

Durante el desarrollo embrionario, los órganos están constituidos por poblaciones esencialmente expansivas, esto es poblaciones celulares en las que la proliferación celular da lugar a un crecimiento debido a la acumulación de células. Después, en el curso del desarrollo postnatal, algunas poblaciones siguen siendo expansivas, mientras que otras se convierten en poblaciones de recambio.

Las poblaciones estáticas carecen de proliferación celular y su crecimiento es atribuible únicamente a aumento del tamaño celular o al depósito de materiales intercelulares.

La población de recambio se caracteriza por una relación entre la reproducción y la diferenciación celulares, de modo que las células no se reproducen indefinidamente sino que dejan de hacerlo a medida que se van diferenciando, hasta perder por completo la capacidad reproductiva.

Al final del proceso de diferenciación, las células de las poblaciones de recambio mueren y son eliminadas. Existe en estas poblaciones una subpoblación constituida por células que se mantienen relativamente indiferenciadas y no pierden la capacidad de reproducción, se trata de las células "madre" o células "fuente" (literalmente células "tallos" del término usual inglés "stem cells") que dan lugar por reproducción a las demás células de la población.

El crecimiento de una población de recambio, es decir, la medida en que no es una población puramente de recambio sino parcialmente expansiva, depende del balance entre la producción y la pérdida de células. En el animal adulto, que mantiene un tamaño estacionario, el balance de las poblaciones de recambio es nulo. Esto significa que estadísticamente cada vez que una célula madre se reproduce da lugar a una célula madre y a una célula destinada a la diferenciación, es decir, la probabilidad de que una de las dos células hijas conserve el carácter de célula madre es de 0,5. En cambio, durante el período de crecimiento y también en los procesos neoplásicos de carácter progresivo dicha probabilidad es mayor de 0,5, con lo cual el número de células madre no se mantiene estacionario sino que aumenta y la población crece.

La relación inversa entre la capacidad de reproducción celular y el grado de diferenciación es claramente manifiesta en las poblaciones de recambio y también en la atenuación del crecimiento de las poblaciones expansivas y su conversión en poblaciones estáticas o de recambio durante el desarrollo. Esta relación ya fué observada por Minot (1908) y especialmente por Schmalhausen (1930), quien atribuyó la disminución progresiva de la velocidad de crecimiento a la diferenciación. Sin embargo, hubo que esperar al desarrollo de los métodos y conceptos de la teoría cinética de poblaciones celulares para que fuera posible un estudio detallado de este fenómeno. Un primer paso en este camino lo constituye el trabajo de Enesco y Leblond de 1962 anteriormente comentado.

La aplicación del método de la Frecuencia de Mitosis marcadas (FLM) a tejidos embrionarios, por ejemplo el trabajo de Brugal (1971) con

embriones de anfibio (Pleurodeles waltii), ha permitido determinar la duración total del ciclo celular (GT) y la de sus intervalos fundamentales en distintas etapas del desarrollo y comparar después las modificaciones observadas en los parámetros del ciclo con el proceso de diferenciación histológica de los órganos estudiados.

Tomaremos el trabajo de Brugal (1971) como paradigma de los estudios de cinética de población celular durante el desarrollo, lo analizaremos críticamente y trataremos de mostrar que, de acuerdo con los modelos estadísticos que dan cuenta de la gran variabilidad intrapoblación de GT, la interpretación de los datos es más compleja que la propuesta por el autor.

El estudio de Brugal comprende las fases 34 a 41 del desarrollo del citado anfibio, que a la temperatura de 17 °C corresponde al período comprendido entre los días 15 a 35 después de la fecundación. Los tejidos estudiados fueron el epitelio gástrico, el telencéfalo y la médula espinal.

La principal conclusión a partir de las gráficas FLM en distintas fases del desarrollo es que la duración total del ciclo (GT) se alarga durante el período estudiado, en estrecha correlación con la aparición de las características morfológicas de diferenciación propias de cada tipo celular. Aunque todos los intervalos se expanden más o menos, el aumento de GT es debido principalmente a la prolongación del intervalo G_1 .

Otro resultado del trabajo es la disminución del coeficiente o índice de proliferación (PI) durante el mismo período. Dicho coeficiente es idéntico a la fracción de crecimiento en la terminología de otros autores (Steel 1977) y equivale a la proporción de células proliferantes sobre el total de células producidas. El valor de PI cuando la totalidad de las células producidas mantiene la actividad proliferativa es de 1 y, en este caso, la función de crecimiento del número de células $N(t)$ puede escribirse de la forma

$$N = N_0 \cdot 2^{t/GT} \quad (65)$$

y, en general

$$N = N_0 \cdot (1 + PI)^{t/GT} \quad (66)$$

El cálculo del índice de proliferación (PI) se realiza a partir del índice mitótico (MI), de la duración de la mitosis (MT) y de la duración total del ciclo (GT), determinadas estas dos últimas a partir de la gráfica FLM. La relación entre estos parámetros es

$$MI = \frac{MT}{GT} \cdot \log (PI + 1) \quad (67)$$

La disminución del índice de proliferación no es igual en los tres tejidos estudiados y está claramente relacionada con el proceso de diferenciación. Así, el PI del epitelio gástrico pasa de 0,77 en la fase 34 a 0,23 en la fase 41, mientras que el PI del telencéfalo pasa de 0,35 a 0,22 en el mismo intervalo. La mayor disminución del PI del epitelio gástrico en comparación con el del telencéfalo se corresponde con un mayor alargamiento de GT y de G_1T en dicho epitelio que en el telencéfalo. Además los cambios morfológicos de diferenciación entre las fases 34 y 41 son muy importantes en el epitelio gástrico, mientras que en el telencéfalo lo son mucho menos, pues en la fase 34 ya está bastante diferenciado.

Si bien el trabajo de Brugal (1971) muestra de forma precisa la relación inversa entre la proliferación y la diferenciación celulares, la interpretación de sus resultados cuantitativos sobre la cinética proliferativa no es tan sencilla. Según hemos visto en los apartados 2.2 y 2.3 de esta tesis referentes al intervalo G_1 y a los modelos estocásticos del ciclo celular, la variabilidad de la duración del ciclo entre células de la misma población, debida esencialmente a G_1T , es considerable y la existencia de una o más interrupciones en el proceso reproductivo a nivel de G_1 es asumido por diversos modelos, como, por ejemplo, el modelo de probabilidad de transición (Burns y Tannock 1970, Smith y

Martin 1974 y Brooks, Bennett y Smith 1980).

Por tanto, el concepto de índice de proliferación resulta bastante ambiguo y, a menos que exista una indicación morfológica clara que permita distinguir las células irreversiblemente quiescentes de las demás, no es posible conocer la proporción real de células proliferantes. Así, por ejemplo, el valor de PI en el epitelio gástrico en la fase 41 es de 0,23, la interpretación "clásica" de este dato, que es la adoptada por Brugal, consiste en admitir la existencia en esta etapa del desarrollo de dos subpoblaciones en dicho epitelio: una, capaz de reproducirse, que corresponde al 23 % del total y otra, que representa el 77 %, constituida por células quiescentes. Sin embargo, el autor manifiesta que no es posible localizar morfológicamente la subpoblación proliferante, puesto que las figuras mitóticas se hallan distribuidas al azar en el tejido.

Realmente, el encontrar un valor de PI inferior a la unidad proviene de la discrepancia entre el índice mitótico observado y la relación entre los valores de MT y GT, determinados a partir de la gráfica FLM.

La problemática relativa a la interpretación de la FLM ha sido considerada en los apartados 2.2 y 2.3, donde hemos comparado la interpretación de Quastler y Sherman (1959) con la del modelo de probabilidad de transición. Sin descartar la existencia de subpoblaciones irreversiblemente quiescentes incluso en tejidos embrionarios, en mayor o menor medida, la discrepancia entre MI y MT/GT depende probablemente de que el índice mitótico es realmente una valoración global de la actividad proliferativa de toda la población, mientras que la estimación de GT a partir de la FLM por el método de Quastler y Sherman (1959), utilizado por Brugal en su trabajo, no es representativa del total de la población, sino que corresponde en realidad a la duración del ciclo de la fracción más rápida de la misma. En efecto, el método del nivel 0,5 mide GT como el tiempo entre los niveles 0,5 de la parte ascendente de la primera y segunda ondas de la gráfica FLM, y, al no tener en cuenta la parte descendente de la segunda onda, desprecia las células más lentas, pero que, sin embargo, se reproducen.

Concluyendo, una interpretación de los datos más de acuerdo con la realidad sería la siguiente :

Durante el período estudiado, la proliferación celular disminuye en los tres órganos a consecuencia de un aumento del tiempo de residencia en los intervalos del ciclo, principalmente en G_1 . Tomando el caso del epitelio gástrico, en la fase 34 : $GT = 42$ h y $PI = 0,77$ y en la fase 41 : $GT = 63$ h y $PI = 0,23$, ello significa que en la fase 34, un 77 % de las células tiene un GT de aproximadamente 42 h, mientras que el 23 % restante tiene un GT mayor de 42 h, y en la fase 41, un 23 % de las células tiene un GT de alrededor de 63 h y el 77 % restante tiene un ciclo de más de 63 h. Naturalmente, cabe la posibilidad de que dentro de la fracción lenta exista una mayor o menor proporción de células permanentemente quiescentes, pero su valor real no puede determinarse a partir de los datos del trabajo comentado.

La proliferación celular en el hígado y su relación con la diferenciación celular durante el desarrollo pre y postnatal ha sido estudiada preferentemente en los roedores, siendo mucho más escasa la información sobre el hígado de embrión de pollo, dejando aparte los trabajos antiguos sobre crecimiento ponderal y microscopía óptica (Schmalhausen 1926 y la revisión de Romanoff 1960).

Las principales características de la proliferación hepatocelular durante el desarrollo embrionario y postnatal en la rata y el ratón son las siguientes (Tsanev 1975) :

- 1- Aumento inicial de la proliferación celular de la parte del intestino anterior que da lugar al primordio hepático. En el ratón, esto ocurre entre los días 10 y 12 del desarrollo embrionario, siendo entonces el índice de marcado con Timidina tritiada de las células endodérmicas de 0,54 mientras que el de las células del primordio alcanza el valor de 0,70.
- 2- Disminución progresiva de la proliferación de los hepatocitos embrionarios (a partir del día 17 en el ratón), hasta alcanzar valores extremadamente bajos que se estabilizan entre el 2º y 3^{er} mes de vida postnatal, donde el índice de marcado es, en la rata, de 0,002 a 0,004 y el

índice mitótico de 0,00005 a 0,00010. Durante la vida postnatal, la actividad proliferativa disminuye más en la parte central de los lobulillos que en la periférica. Ello depende, probablemente, de la drástica alteración del riego sanguíneo hepático en el nacimiento (Le Bouton y Marchand 1970). El crecimiento postnatal del acino hepático depende inicialmente del aumento del número de células y posteriormente del aumento del tamaño celular (Le Bouton 1974).

3- La disminución progresiva de la proliferación no es uniforme durante todo el desarrollo, sino que existen tres descensos relativamente bruscos entre los días 17 y 18 del desarrollo embrionario, inmediatamente después del nacimiento y en el primer mes de la vida postnatal.

4- La disminución de la actividad proliferativa es debida fundamentalmente a una disminución del índice de proliferación o fracción de crecimiento. En la rata, después del nacimiento, se produce una caída exponencial de la proporción de hepatocitos proliferantes : 1 día - 0,32, 3 semanas - 0,10 y 8 semanas - 0,05 (Post y Hoffman 1964). La disminución de la fracción de crecimiento podría interpretarse como una prolongación indefinida de G_1 o como un estado de quiescencia G_0 , sin embargo, la iniciación relativamente sincrónica de la síntesis de DNA por los hepatocitos después de la hepatectomía parcial invalida la primera interpretación y fundamenta la segunda (Lajtha 1963).

5- Durante el desarrollo postnatal se produce un alargamiento de las fases S, G_2 y M que se estabiliza a partir del primer mes en los siguientes valores :

$$G_1T = 20-26 \text{ h}, \quad ST = 8 \text{ h}, \quad G_2T \text{ más } MT = 3,5-4 \text{ h}$$

6- A partir de las 3 semanas de desarrollo postnatal aparece una oscilación circadiana de la actividad mitótica en el hígado de rata y también un proceso de poliploidización y de formación de células binucleadas. Los hepatocitos poliploides y binucleados tienen una capacidad proliferativa menor que los hepatocitos diploides (Post y Hoffman 1965).

Los cambios en la actividad proliferativa van acompañados de modificaciones en el fenotipo enzimático. En la rata, coincidiendo con los tres

períodos señalados de mayor disminución de la actividad proliferativa, hacen su aparición tres grupos de enzimas hepáticos : al primer grupo, que aparece entre los días 17 y 18 del desarrollo, pertenece la Fructosa-1-P-aldolasa; al segundo, que aparece en los primeros días después del nacimiento, pertenece la Fosfoenolpiruvato-carboxilasa y al tercero, que aparece a la tercera semana, pertenece la Triptófano-oxigenasa.

Es posible relacionar la aparición de los tres grupos de enzimas con los cambios que se producen en el sistema endocrino durante el desarrollo. En efecto, la aparición del primer grupo coincide con la entrada en funcionamiento de la hipófisis, la corteza suprarrenal, el tiroides y los islotes pancreáticos ; la del segundo, está asociada a la secreción de glucagón y adrenalina determinada por la hipoglicemia neonatal y la del tercero coincide con el restablecimiento del eje corticohipofisario y el cambio en la alimentación (Greengard 1970).

Entre otros cambios en el fenotipo proteico hepatocelular durante el desarrollo cabe destacar el aumento progresivo de la síntesis y secreción de albúmina sérica, el cambio inverso con respecto a la alfa-fetoproteína (De Néchaud y Uriel 1971) y el aumento de la actividad Glucógeno-sintasa, que se correlaciona con el aumento de los depósitos de glucógeno (Watts y Gain 1976).

Todos los cambios del patrón proteico descritos en el proceso de diferenciación hepática se hallan estrechamente ligados a la actividad proliferativa y son reversibles. Así, durante la regeneración hepática se observan regresiones a patrones enzimáticos propios del hígado inmaduro, que vuelven a la normalidad una vez finalizada la respuesta regenerativa (ver Tsanev 1975).

Sin embargo, hay que distinguir estos cambios reversibles de la aparición en el desarrollo del tipo hepatocelular. Esto ocurre probablemente cuando, mucho antes de los cambios descritos, algunas células endodérmicas del intestino anterior inician el brote proliferativo que da lugar al primordio hepático. Es posible que en esta etapa temprana exista un paso irreversible de diferenciación dependiente del ciclo celular,

esto es, un ciclo celular cuántico, como los descritos para la diferenciación de los mioblastos (Dientsmann y Holtzer 1975), de los eritroblastos (Weintraub 1975) y de las células eritroleucémicas de Friend (Harrison y Conkie 1981). En estos tres casos existe un marcador de diferenciación (miosina, en el primero, y hemoglobina, en los otros dos) cuya aparición define la del nuevo tipo celular. En el caso del hígado no se ha descrito un marcador de diferenciación durante la formación del primordio del órgano, lo cual impide ensayar, por el momento, la ciclodependencia de la diferenciación hepatocelular inicial.

En el embrión de pollo, los principales cambios en el proceso de diferenciación del hepatocito han sido descritos cualitativamente a nivel morfológico (microscopía óptica) por diversos autores (véase Romanoff 1960) :

- El tamaño celular aumenta apreciablemente en dos fases del desarrollo, el primer aumento ocurre entre los días 4 y 6, y el segundo a partir del día 12, dependiendo este último de la acumulación de inclusiones lipídicas en el citoplasma. La longitud y el número de mitocondrias aumenta progresivamente a partir del día 6 hasta el 18. El aparato de Golgi se encuentra inicialmente cerca del núcleo y posteriormente se expande y se desplaza hacia el capilar biliar. Las inclusiones lipídicas aparecen en los hepatocitos entre los días 6 y 8, aumentando en número y tamaño hasta el final del desarrollo embrionario; inicialmente se componen principalmente de fosfolípidos y a partir del día 11 empiezan a acumular colesterol, haciéndose birrefringentes. Los depósitos de glucógeno aparecen el día 7, alcanzan un máximo hacia el día 9 y disminuyen hasta el 12, aumentando progresivamente desde el día 14 hasta el final del período embrionario. -

Aunque poco abundantes, existen algunos trabajos sobre la diferenciación de los hepatocitos embrionarios de pollo a nivel molecular. Así, Warshaw (1972) ha investigado el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado de embrión de pollo, comparándolo con el de la rata fetal y ha llegado a las siguientes conclusiones :

Mientras que el feto de mamífero es altamente dependiente de la glucosa transplacentaria, el embrión de pollo depende principalmente de los lípidos del vitelo. No resulta sorprendente, por tanto, el encontrar que el embrión de pollo es capaz de realizar la activación, transferencia y oxidación de los ácidos grasos a diferencia de lo que ocurre en la rata fetal. Hacia el día 15 del desarrollo embrionario del pollo se observa en el hígado un pico de las actividades enzimáticas correspondientes a la activación de los ácidos grasos y a la Palmitilcarnitina-transferasa, lo cual coincide con un período de aumento del contenido lipídico del hígado. La Acetil-CoA-sintetasa y la Palmitilcarnitina-transferasa son enzimas mitocondriales y, probablemente, el aumento observado en su actividad depende no solo de una mayor actividad específica de dichas enzimas, sino también de un incremento en el número de mitocondrias.

Mason y Hooper (1969) sugieren también un aumento de la cantidad de mitocondrias en el hígado de embrión de pollo, basándose en sus resultados con la enzima mitocondrial Glutamato-deshidrogenasa.

El metabolismo del glucógeno en el hígado de embrión de pollo ha sido estudiado por Houssant y Douarin (1974) : Mediante métodos citotóxicos han demostrado la presencia de glucógeno no sólo en el esbozo hepático, sino incluso en el endodermo hepático presuntivo en el embrión de 20 somitas. Hasta el día 6 del desarrollo, la cantidad de glucógeno en los hepatocitos es relativamente pequeña y se mantiene constante, presentándose en forma de partículas beta. A partir del día 6, el contenido de glucógeno aumenta rápidamente y aparecen las partículas alfa (rosetas). La actividad Glucógeno-sintetasa aumenta a partir del día 6, alcanzando un máximo el día 12 y disminuyendo a partir de entonces hasta la eclosión. La capacidad de sintetizar glucógeno es, por tanto, una de las primeras características funcionales que caracterizan a los hepatocitos de embrión de pollo. Existe la posibilidad de una regulación hormonal de dicha actividad en etapas embrionarias relativamente tempranas, ya que la presencia de insulina y glucagón ha sido puesta de manifiesto por inmunocitoquímica en el embrión de 3 días (Dieterlen-Lièvre

y Beaupain 1974 y Beaupain y Dieterlen-Lièvre 1974) y la de catecolaminas en embrión de 4 días (Enemar, Falck y Hakanson 1965).

Zaccheo y Grossi (1967) han estudiado la síntesis de albúmina sérica en embrión de pollo y han demostrado que hasta el día 6 del desarrollo, la albúmina sérica es suministrada al embrión por las reservas del vitelo y que entre los días 6 y 8 empieza a ser sintetizada por el hígado coincidiendo con el aumento de los depósitos de glucógeno.

El crecimiento ponderal del hígado de embrión de pollo (Schmalhausen 1926) se caracteriza por dos etapas en cuanto a la variación de la velocidad específica. En la primera (del día 3 al 8) la velocidad específica disminuye considerablemente: El incremento porcentual del peso entre los días 3 y 4 es del 900 %, mientras que entre los días 7 y 8 es del 58 %. En la segunda etapa (del día 8 hasta el final del período embrionario) la velocidad específica presenta pequeñas oscilaciones con tendencia a la disminución progresiva, pero variando realmente muy poco y situándose el incremento porcentual diario alrededor del 25-30 %.

A pesar de la relativa antigüedad de los datos sobre crecimiento ponderal del hígado de embrión de pollo, no tenemos noticia de ningún estudio en profundidad de la cinética proliferativa del hepatocito embrionario de pollo in vivo. La razón de ello estriba probablemente en la dificultad de aplicar la técnica de la Frecuencia de Mitosis marcadas al huevo de gallina. Esta técnica es la generalmente utilizada en el análisis cinético del ciclo celular y requiere que las células sean expuestas a la Timidina tritiada durante un intervalo de tiempo muy corto (pulsación), de modo que las células marcadas constituyan una cohorte limitada a la extensión de la fase S del ciclo. Esta condición se consigue fácilmente en los cultivos celulares cambiando el medio de cultivo y en los animales enteros por los mecanismos naturales de degradación y excreción de metabolitos, que evita la incorporación continua y el reciclaje. El carácter casi cerrado del hevo de gallina permite suponer que esta condición no se cumpliría.

Efectivamente, en un estudio de incorporación de Timidina tritiada

realizado por Wilson (1973) para la caracterización del ciclo celular en células neuroepiteliales del embrión de pollo, la administración de una sola dosis de 25 microCi / embrión de Timidina tritiada de 2 mCi / mM da lugar a una incorporación acumulativa, con lo cual no es posible aplicar la técnica de la Frecuencia de Mitosis marcadas. En este caso, únicamente es posible una apreciación grosera de la duración de los intervalos por el método del marcado acumulativo de Fujita (1962).

Por esta razón, no hemos intentado la utilización de la técnica de la FLM en esta tesis, empleando, en su lugar, el método de la acumulación mitótica y otro, original nuestro, que hemos llamado "Coincidencia Mitótica". La combinación de estos dos métodos, si bien no proporciona tanta información como el de la FLM, permite determinar la duración media del ciclo celular y también la variabilidad de este parámetro entre células hermanas, lo cual resulta imprescindible para discutir los resultados en relación a los modelos del ciclo celular.

2.6.3 Regulación de la proliferación celular y el crecimiento de órganos

La regulación del crecimiento de los órganos en el embrión y en el animal joven, así como el mantenimiento de los órganos adultos depende del control de la proliferación celular. El esclarecimiento de los mecanismos correspondientes es todavía un problema sin resolver aunque hay respuestas para aspectos parciales del mismo.

En la evolución histórica de la investigación sobre el control de la proliferación celular pueden destacarse cuatro etapas parcialmente superpuestas :

- 1ª- La formulación de hipótesis generales sobre la regulación de la proliferación celular a partir de datos meramente cinéticos.
- 2ª- La identificación de factores reguladores de la proliferación celular en la sangre circulante, en los tejidos o en los cultivos celulares.
- 3ª- El análisis de los mecanismos de acción de los factores reguladores en relación a la dinámica molecular del ciclo de reproducción celular

4^a- La síntesis de los diferentes datos sobre la regulación de la proliferación para un tipo celular concreto, en condiciones ambientales definidas y la construcción, a partir de ella, de un modelo cuyas hipótesis puedan ser probadas, haciendo así posible un ajuste progresivo del modelo a la realidad experimental.

Entre los modelos generales sobre regulación de la proliferación celular y el crecimiento de órganos, el ideado por Weiss y Kavanau (1957) es probablemente el que mayor influencia ha tenido, no solamente como paradigma de otros trabajos teóricos, sino también como estímulo de numerosos trabajos experimentales.

En esencia, el modelo de Weiss y Kavanau (1957) consiste en un sistema de crecimiento autolimitado con tres componentes fundamentales : la masa generativa o componente autorreproductible, la masa diferenciada que deriva de la anterior y el inhibidor del crecimiento, que es producido por el propio sistema en cantidad proporcional a la masa generativa.

El modelo tiene en cuenta los siguientes fenómenos : crecimiento de la masa generativa, transformación de masa generativa en masa diferenciada, síntesis del inhibidor, pérdida catabólica de masa diferenciada y pérdida catabólica de inhibidor. Además, tanto el crecimiento de la masa generativa como la diferenciación están sometidos a un control negativo cuya magnitud es proporcional a la concentración de inhibidor.

La estructura matemática del modelo se basa en tres ecuaciones diferenciales, que describen la variación de la masa generativa, la variación de la masa diferenciada y la variación de la cantidad de inhibidor. Las soluciones de dichas ecuaciones son tres funciones sigmoides, que, eligiendo los valores adecuados de los parámetros, describen con bastante aproximación el crecimiento embrionario y postembrionario del pollo y también la regeneración hepática posthepatectomía parcial en la rata (Kavanau 1960).

Una predicción interesante del modelo es que el volumen de dilución del inhibidor, que corresponde como mínimo a los espacios líquidos extracelulares

vascular y extravascular, es inicialmente una fracción importante del volumen total y a medida que el sistema se aproxima al estado estacionario dicha fracción se hace cada vez menor, lo cual concuerda con la progresiva "densificación" de los organismos observada a lo largo del desarrollo.

En el modelo de Weiss y Kavanau (1957), cada órgano controla independientemente su propio crecimiento mediante la producción del correspondiente inhibidor específico. La coordinación de la cinética de crecimiento de los órganos, comprobada en el desarrollo de diferentes especies (Huxley 1924 y 1932 y Brody 1945) implica, según hemos visto anteriormente, una variación equiproporcional de las velocidades específicas de crecimiento. Este aspecto, no considerado por los autores, podría explicarse, sin embargo, a partir del modelo como consecuencia de la variación equiproporcional de las concentraciones de los inhibidores específicos que comparten un volumen de dilución común.

El modelo de Tanner (1963), derivado del anterior, propone un elemento integrador que explica de forma más directa la coordinación de los crecimientos. Este modelo supone que un solo tipo de inhibidor es producido por uno o más órganos, de modo que su concentración en la sangre es proporcional al tamaño del cuerpo. El inhibidor no actuaría directamente sobre todas las células, sino sobre un contador situado en el Sistema Nervioso Central. El contador mediría la edad del animal, aumentando el número de receptores para el inhibidor. La concentración real del inhibidor en un momento dado sería comparada a nivel del contador central con la concentración "esperada" de acuerdo con la edad. La discrepancia entre ambas cantidades podría medirse por el número de receptores no ocupados. El contador generaría en todo momento señales estimulantes del crecimiento proporcionales al valor de la discrepancia. La señal estimulante consistiría en un factor de crecimiento difusible que actuaría de forma más o menos directa sobre los diferentes tipos celulares del cuerpo.

El modelo de Tanner ha sido pensado especialmente para explicar la regulación del crecimiento global en el hombre y da cuenta de la recuperación

del crecimiento tras diversos tipos de retrasos, sin embargo, no explica el control específico del crecimiento manifiesto en la regeneración de órganos. El hecho de que el Sistema Nervioso Central se desarrolle antes que la mayor parte de los órganos del cuerpo resulta lógico si se admite, de acuerdo con el modelo, que el contador que programa el crecimiento del resto del cuerpo se encuentra allí.

Kiefer (1968) propone un modelo de control de la proliferación celular basado, como el de Weiss y Kavanau, en un sistema de retroalimentación negativa, ejercida en este caso por células maduras resultantes de la diferenciación sobre la velocidad de reproducción de las células madre indiferenciadas y realiza a partir del modelo una simulación analógica de la cinética de población celular en condiciones de irradiación continua.

Folkman y Hochberg (1973) han demostrado experimentalmente la autolimitación del crecimiento de esferoides multicelulares de diversas clases de células neoplásicas en cultivo, llegando a la conclusión de que existe un tamaño máximo alcanzable en condiciones óptimas de renovación del medio de cultivo. Estos resultados pueden explicarse mediante modelos de retroalimentación negativa semejantes al de Weiss y Kavanau (1957) en los que se tiene en cuenta la forma geométrica del sistema (Riley 1969 y 1970, Wheldon et al. 1970 y Shimko y Glass 1976). En estos modelos la relación superficie/volumen condiciona la concentración del inhibidor dentro del esferoide, ya que la producción se supone proporcional al volumen y la pérdida proporcional a la superficie. Otra característica de estos modelos geométricos es la existencia de un gradiente de velocidad de reproducción o de fracción de crecimiento: Esto está de acuerdo con el trabajo experimental de Folkman y Hochberg (1973) y de otros autores (ver Steel 1977) que muestran como en los esferoides tumorales in vitro o in vivo únicamente las capas más externas de células muestran mitosis o incorporación nuclear de timidina tritiada, mientras que las células centrales son quiescentes y mueren, equilibrando en el estado estacionario la producción cortical. Sin embargo, la hipótesis del inhibidor no es la única explicación posible y, probablemente, las deficiencias nutritivas

y de oxígeno en el interior del esferoide tienen, al menos, un papel importante, en este sentido sería aplicable la función de crecimiento de von Bertalanffy (1949) basada, según hemos visto, en el balance entre anabolismo y catabolismo, siendo la degradación proporcional a la masa del esferoide (volumen) y la biosíntesis a las posibilidades de captación de nutrientes y de oxígeno a través de la superficie del mismo.

La introducción de consideraciones geométricas en los modelos de control de crecimiento es interesante no solamente para el caso de los esferoides tumorales, sino también en sistemas embrionarios en los que la difusión molecular puede ser el mecanismo determinante de los gradientes morfogenéticos (Crick 1970). Los gradientes de concentración de factores inhibidores o estimulantes de la proliferación celular podría explicar las diferencias regionales en el índice mitótico que se producen en ciertos órganos durante el desarrollo, conjuntamente con el aumento de tamaño y el cambio de forma del esbozo como, por ejemplo, los miembros en el embrión de pollo (Hornbruch y Wolpert 1970).

Todos los modelos anteriores, geométricos o no, son modelos continuos en el sentido de que suponen una variación continua de la velocidad específica de crecimiento, dando lugar a las correspondientes curvas de crecimiento sigmoides.

Sin embargo, hemos visto que Goedbloed (1972, 1974, 1975, 1976 y 1977) estudiando el crecimiento embrionario y postnatal del ratón y de la rata llega a la conclusión de que las curvas de crecimiento reales se describen mejor por una serie de exponenciales, con transición brusca de una a otra, que por una función continua, aunque el conjunto de las exponenciales se aproxima a una sigmoide continua.

Para explicar esta cinética, Goedbloed (1975) propone un modelo genético para el control de la velocidad de reproducción celular, según el cual el ciclo celular vendría controlado negativamente por una serie de genes "A" ($A_1 A_2 A_3 \dots A_n$) que podrían estar alternativamente en forma activa, reprimiendo la progresión del ciclo celular, o inactiva. La reproducción de la célula ocurriría únicamente cada vez que toda la serie

de genes A estuviera en la forma inactiva.

Los genes A estarían, a su vez, sometidos a control negativo formando parte de n circuitos genéticos en los que un gen reprime al siguiente. Cuando el número de genes es impar, estos circuitos no se estabilizan, lo cual significa que los genes oscilan permanentemente entre el estado activo y el inactivo. Estos circuitos genéticos funcionan de forma asincrónica debido a la gran variabilidad intrínseca de los sistemas de reacciones con número muy bajo de moléculas. La probabilidad de coincidencia de los circuitos en el estado inactivo del gen A determinaría la frecuencia del ciclo celular, de modo que cuando un nuevo circuito entra en acción dicha probabilidad disminuiría bruscamente a un nuevo valor.

La entrada en funcionamiento en la mayor parte de células del cuerpo de un circuito genético adicional determinaría una transición brusca a una velocidad específica de crecimiento inferior, que se mantendría invariante hasta que se produjera la entrada en funcionamiento de otro circuito y así sucesivamente.

En realidad, el modelo de Goedbloed no es incompatible, sino más bien complementario de los modelos de retroalimentación negativa de carácter continuo. Cualquiera de éstos podría convertirse en discontinuo, suponiendo simplemente que la respuesta celular al inhibidor no es continua sino que tiene lugar según una serie de umbrales de sensibilidad.

El modelo de Weiss y Kavanau (1957) no solamente ha sido el paradigma de los trabajos teóricos sobre control humoral de la reproducción celular, sino que además ha motivado enormemente el trabajo experimental. Aunque antes de la publicación del modelo ya se habían hecho algunos intentos de aislar factores inhibidores específicos de la proliferación celular, por ejemplo, el trabajo de Saetren (1956) sobre autorregulación de crecimiento del hígado y del riñón, la mayor parte de los trabajos sobre factores inhibidores aparecen a partir de 1960 y mencionan el trabajo de Weiss y Kavanau (1957).

A principios de los años 60, Iversen en Oslo y Bullough en Londres desarrollan independientemente la hipótesis del control de la proliferación

celular en la epidermis por factores inhibidores, siendo Bullough quien adopta el nombre de Chalonas para designar a dichos factores (Iversen 1960, Bullough y Laurence 1960 y Bullough 1962).

El término Chalona, del griego chalao = aflojar, había sido propuesto por Schäfer en el 7º Congreso Internacional de Medicina de Londres (1913) para designar a los factores inhibidores en oposición a Hormona, del griego hormao = excitar, que designaría a los factores estimulantes. La propuesta de Schäfer no fue aceptada y hasta ahora la palabra Hormona ha sido utilizada ampliamente con independencia de si la acción reguladora del mediador era estimulante o inhibidora (Iversen 1976).

Realmente, las chalonas son más un concepto teórico que una entidad químicamente definida, a pesar de los considerables esfuerzos que se han realizado por numerosos autores, ninguna chalona ha sido completamente purificada todavía (Iversen 1981).

Las características que definen a priori a las chalonas son las siguientes (Iversen 1976 y 1981):

- 1ª- Sustancia inhibidoras de la proliferación celular naturales y fisiológicas.
- 2ª- Producidas y localizadas en los tejidos o líneas celulares sobre los que actúan pero con capacidad de difundir por todo el medio interno.
- 3ª- De acción específica o, al menos, preferente sobre el tejido o línea celular que los produce.
- 4ª- Acción atóxica y reversible consistente en inhibir la progresión del ciclo celular.

Diversas preparaciones de chalonas, más o menos purificadas, han sido obtenidas a partir de extractos de tejidos o de medios de cultivo condicionados. El ensayo de su actividad, necesario para el proceso de purificación y aislamiento, consiste en medir el efecto del preparado sobre la incorporación de timidina tritiada al DNA o sobre la actividad mitótica en el tejido o cultivo específicos.

La posibilidad de artefactos en este tipo de ensayos debe tenerse en cuenta. En muchos casos, los efectos inhibitorios resultan de efectos

citotóxicos generales o de modificaciones de los niveles de hormonas circulantes a consecuencia del "stress" producido por la inyección de grandes cantidades de proteínas extrañas. Además, la disminución de la incorporación de timidina tritiada al DNA no siempre significa inhibición de la proliferación celular.

Para probar la especificidad de tejido hace falta hacer dos tipos de controles : el ensayo del preparado sobre tejidos distintos del tejido a partir del cual se ha obtenido y el ensayo de preparados de otros tejidos sobre el tejido de referencia (véase, por ejemplo, Nome 1975).

Hay una gran cantidad de trabajos publicados sobre supuestas chalonas (Houck 1976 e Iversen 1981 : revisiones amplias). A partir de diversos tejidos y órganos se han obtenido extractos, se ha ensayado la acción inhibidora sobre la proliferación celular del tejido de origen y se ha intentado con más o menos éxito la purificación del factor responsable de la actividad inhibidora, sin haber llegado en ningún caso a una purificación comparable a la de las hormonas bien identificadas. En la mayor parte de casos se trata de preparaciones heterogéneas que contienen glicopéptidos o glicoproteínas, con acción inhibidora de la progresión del ciclo celular a nivel del intervalo G_1 o del intervalo G_2 .

Entre los diversos tejidos para los que ha sido descrita una o más chalonas, la epidermis, las líneas celulares hematopoyéticas (granulocítica, eritrocítica y linfocítica), el intestino delgado, el hígado y los fibroblastos son los que mejor han sido estudiados y cuyos preparados inhibidores están mejor purificados (Houck 1976 e Iversen 1981), sin embargo, aun en estos casos, se desconoce la importancia fisiológica de los factores aislados.

Con respecto al control del crecimiento del hígado, existen muchos trabajos que demuestran la existencia de factores reguladores circulantes, que controlan la respuesta regenerativa del órgano después de la hepatectomía parcial (Bucher y Malt 1971 y Sigel 1972). Los intentos de explicar la regulación de la regeneración hepática por un solo factor, estimulante o inhibidor, han fracasado y actualmente se admite un control

complejo por diversos factores (Leffert et al. 1979).

Además de los factores humorales estimulantes, que desde luego intervienen (ver más adelante), dos tipos de inhibidores específicos de la proliferación hepatocelular han sido identificados por diversos autores : uno o más polipéptidos de peso molecular inferior a 10.000 daltons y un grupo de proteínas de peso molecular mayor de 40.000 daltons. No es seguro que se trate de factores independientes, ya que el factor (es) de alto peso molecular sea un agregado o que el péptido inhibidor pueda unirse a una proteína transportadora (Verly et al. 1971, Verly 1976, Nadal 1979 e Iversen 1981).son posibilidades que no pueden descartarse.

Nada seguro y generalizable puede decirse con respecto al mecanismo de acción de las chalonas, puesto que no se dispone de ninguna completamente purificada. Sin embargo, al tratarse de péptidos o proteínas, cabe pensar que actúen a través de la unión con receptores específicos de la membrana celular de forma parecida a las hormonas polipeptídicas y los factores de crecimiento. Es interesante constatar que uno de los factores inhibidores de la proliferación de los fibroblastos en cultivo, el Factor Regulador del Crecimiento de los Fibroblastos (FGRF), es probablemente una glicoproteína que se encuentra débilmente unida a la membrana celular (Datta 1981).

La investigación sobre los factores inhibidores de la proliferación celular está limitada por la aparente dificultad de conseguir una adecuada purificación de las sustancias activas. El campo de los Factores de Crecimiento, esto es, las sustancias capaces de estimular la proliferación celular en un medio nutritivamente completo (Rudland y Jiménez de Asua 1979), presenta un panorama completamente distinto. Existen actualmente diversos factores bien caracterizados a nivel molecular, cuyas propiedades biológicas han estudiadas en cultivos celulares y cuyo mecanismo de acción empieza a ser desentrañado. La diferencia entre ambos campos depende probablemente de que el ensayo de los factores estimulantes está libre, por diversas razones, de los artefactos de citotoxicidad que oscurecen los resultados de los ensayos de inhibición.

Existen varias revisiones recientes sobre factores de crecimiento, en las que basaremos nuestra exposición : Leffert y Koch (1977), Bradshaw y Niall (1978), Rudland y Jiménez de Asua (1979), Blundell y Humbel (1980), Smith (1981) y Baserga (ed) (1981).

El descubrimiento de los factores de crecimiento arranca del hecho, conocido desde hace bastantes años, de que los cultivos celulares requieren suero para su crecimiento. En este aspecto se comportan de distinta manera las células normales y las células derivadas de tumores o transformadas in vitro : Estas últimas, a diferencia de las normales, tienen un requerimiento de suero relativamente bajo. Durante mucho tiempo la acción estimulante del suero era algo misterioso debido a la extremada complejidad de composición del mismo.

La hipótesis de trabajo de diversos autores en relación al efecto del suero ha sido de que debían existir determinadas sustancias activas responsables de la acción estimulante del suero y que podrían aislarse a partir del mismo o más fácilmente a partir de tejidos o de cultivos de células transformadas, donde las concentraciones serían más altas.

Diversos factores, todos ellos de carácter polipeptídico excepto las prostaglandinas, han sido purificados a partir de distintas fuentes, a continuación resumimos las características principales de los mejor caracterizados :

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) : Existen dos preparados, uno obtenido de cerebro y otro de hipófisis bovinos, este último es una proteína de peso molecular 13.000 daltons y de carácter básico, activa a concentraciones de 0,1 nM. El FGF estimula la proliferación de muchos tipos celulares : fibroblastos, células endoteliales, células amnióticas, células gliales, mioblastos, células musculares lisas, condrocitos, células del blastema de regeneración de la extremidad en los anfibios etc.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) : Aislado a partir de glándula submaxilar del ratón macho adulto, tiene un peso molecular de 6.045 daltons y su secuencia de aminoácidos ha sido identificada. Existe un EGF humano que se obtiene de la orina y es idéntico a la Urogastrona,

ya conocida anteriormente por su función reguladora de la secreción gástrica. El EGF de ratón y el humano son muy parecidos, de 53 AA de la molécula 37 son los mismos en ambos. La actividad estimulante del EGF ha sido comprobada sobre células epidérmicas, sobre otros tipos celulares epiteliales (por ejemplo los hepatocitos) y también sobre fibroblastos.

Somatomedinas : Pueden aislarse del suero. No se encuentran concentradas en ningún órgano en particular, pero se supone que son producidas por el hígado (ver más adelante). Su concentración en el suero está controlada por la Hormona de Crecimiento. Existen cinco formas distintas, Somatomedina A, IGF I y IGF II (IGF = Insulin-like Growth Factor), Somatomedina C y MSA (Multiplication stimulating activity). Los cinco factores estimulan la incorporación de sulfato a los proteoglicanos del cartílago y la proliferación de los fibroblastos. Existe otra forma, la Somatomedina B, que es mitogénica para las células de la glía pero no es activa sobre el cartílago. Las distintas somatomedinas están constituidas por una sola cadena polipeptídica de peso molecular entre 5.000 y 10.000 daltons y están relacionadas estructuralmente con la Insulina. Por esta razón compiten con la Insulina para unirse al receptor de esta última y presentan efectos parecidos a la insulina sobre los adipocitos y las células musculares.

Eritropoyetina : Hormona circulante producida por el riñón y también por el hígado fetal, que estimula la proliferación y la diferenciación de los proeritroblastos. La activación del gen de la globina determinada por este factor de crecimiento tiene lugar a través de un ciclo celular cuántico. La eritropoyetina de oveja es una glicoproteína de peso molecular 46.000 daltons que contiene un 11 % de ácido siálico.

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) : Se obtiene plasma rico en plaquetas. Es producido por los megacariocitos quedando almacenado en los gránulos alfa de las plaquetas. Tiene un peso molecular de 30.000 daltons aproximadamente. Es un mitógeno muy potente que estimula la proliferación de fibroblastos, células musculares lisas y células gliales. Su acción es complementaria de la del Plasma pobre en plaquetas (PPP),

ya que ninguno de estos factores por sí mismo estimula la síntesis de DNA en los cultivos quiescentes. Así, en fibroblastos BALB/c3T3 quiescentes es necesario un tratamiento de 2 horas de 3 ng/ml de PDGF y después hace falta el PPP para conseguir la iniciación de la síntesis de DNA al cabo de 12 horas después de suministrar el PDGF.

Prostaglandinas : Derivados cíclicos de ácidos grasos no saturados como el linoleico. Poseen una gran variedad de acciones de tipo hormonal. Aunque inicialmente se aislaron del líquido seminal, se encuentran en muchos tejidos animales y son producidas por células en cultivo. La Prostaglandina F 2 alfa (PGF 2alfa), de 450 daltons, se obtiene principalmente de fibroblastos BHK transformados y es un potente mitógeno para los fibroblastos de ratón 3T3.

Factor de crecimiento neural (NGF) : No es un factor mitogénico pero estimula el crecimiento del cuerpo neuronal y de las neuritas y aumenta la supervivencia in vitro de las neuronas. Se obtiene de diversas fuentes como la glándula submaxilar del ratón, los venenos de varias serpientes y es segregado por muchos tipos celulares en cultivo. La molécula de NGF es un dímero constituido por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 118 AA.

El ensayo de los factores de crecimiento mitogénicos se basa en su propiedad de estimular la síntesis de DNA en cultivos celulares quiescentes. Después de añadir suero o factores de crecimiento apropiados se producen una serie de cambios metabólicos y al cabo de unas 12-15 horas se inicia la síntesis de DNA, que se detecta por la incorporación de timidina tritiada. La entrada de las células en la fase S no se produce de forma completamente sincrónica, sino de forma más o menos dispersa y con una cinética aproximadamente exponencial : Esto ha permitido suponer que en alguna parte del proceso de activación existe una transición de probabilidad constante (Smith y Martin 1973 y 1974).

El mecanismo de acción de los factores de crecimiento ha podido ser estudiado con cierto detalle en algunos casos. Por ejemplo, el Factor de crecimiento epidérmico (EGF) interacciona con receptores de la membrana

y es internalizado mediante endocitosis y finalmente degradado en los lisosomas. El efecto más inmediato del EGF en la membrana es la activación de una proteínquinasa de la propia membrana celular (Haigler y Cohen 1979 y Carpenter 1981). El factor de crecimiento fibroblástico (FGF) estimula específicamente la fosforilación de una proteína de la membrana (Nielsen-Hamilton, Wahll y Martin 1979).

Probablemente la estimulación de proteínquinasas de membrana y el fenómeno de la internalización son comunes a muchos factores de crecimiento. Un problema importante es el de la significación funcional de la internalización, es decir, si la unión del factor de crecimiento con su receptor de membrana desencadena por sí misma el proceso de activación y la internalización es simplemente un paso necesario para la degradación de la molécula, o bien, si el factor de crecimiento o alguno de sus productos de degradación poseen algún blanco de acción intracelular al que llegarían a través del proceso de internalización.

Durante el período de latencia que precede a la síntesis de DNA se producen en todas las células quiescentes estimuladas por el suero o por factores de crecimiento purificados una serie de cambios metabólicos (Smith 1981, Leffert y Koch 1977) :

Estimulación de la bomba de sodio-potasio

Aumento de la captación de 2-deoxi-D-glucosa

Fosforilación y atrapamiento intracelular de la uridina

Cambios en la captación de aminoácidos

Aumento de la captación de fosfato

Cambios en las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos

Aumento de la síntesis de RNA y de proteínas

Síntesis de poliaminas

No es claro que todos estos cambios estén necesariamente ligados a la preparación para la síntesis de DNA y la reproducción celular, aunque es probable que algunos de ellos formen parte de un mecanismo común de activación reproductiva compartido por muchos tipos celulares. Sin embargo, dicho mecanismo debería tener distintas formas de desencadenamiento que

posibilitaran un control específico de la proliferación celular por factores de regulación humoral diferentes según la clase de célula.

La acción de los factores de crecimiento puede ser modulada por diversas hormonas, así, por ejemplo, la Insulina potencia el efecto de la PGF 2alfa y del EGF sobre los fibroblastos de ratón 3T3 (Rudland y Jiménez de Asua 1979). La interacción positiva o negativa entre factores de crecimiento y hormonas ha sido detalladamente estudiada en el modelo de las células 3T3 quiescentes (Rudland y Jiménez de Asua 1979) y también en los hepatocitos en cultivo (Leffert y Koch 1977), habiéndose llegado a determinar un patrón temporal de sensibilidad de las células a diversos factores de crecimiento y hormonas durante la fase de transición del estado quiescente a la proliferación.

Una conclusión bastante general es que varios pares de factores de crecimiento o factor de crecimiento-hormona, que presentan interacción positiva para el estímulo de la síntesis de DNA en poblaciones celulares quiescentes, parecen actuar en dos partes distintas del proceso de activación: al principio y al final del tiempo de latencia. Por ejemplo, esto ocurre en el par PGF 2alfa - Insulina (Jiménez de Asua et al. 1977) y en el par PDGF - PPP (Pledger et al. 1978), donde el primer factor actúa al principio y el segundo al final del tiempo de latencia.

Brooks, Bennett y Smith (1980) han publicado una nueva versión del modelo de probabilidad de transición del ciclo celular, que tiene en cuenta estos hechos y supone la existencia de dos transiciones estadísticas. Aunque este modelo ha sido ideado fundamentalmente para explicar la respuesta de las poblaciones celulares quiescentes a los factores de crecimiento y hormonas, los autores creen que puede aplicarse de forma general al ciclo de reproducción de células de mamífero en cualesquiera circunstancias.

Ya que la mayoría de experimentos sobre factores de crecimiento se han realizado en cultivos celulares, es obligado preguntarse hasta que punto los resultados obtenidos son extrapolables al organismo, es decir, cuál es realmente el papel fisiológico de estos factores.

Aunque posiblemente muchos factores de crecimiento y especialmente los que se encuentran en la sangre tienen un papel en el control de la proliferación celular in vivo, únicamente hay evidencias directas en este sentido para las somatomedinas.

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la hormona de crecimiento condujeron a la hipótesis de que el crecimiento del esqueleto no era estimulado directamente por dicha hormona sino mediante factores séricos inducidos por la hormona (Salmon y Daughaday 1957). Estos factores, conocidos como Somatomedinas, han sido aislados y purificados a partir del suero (ver revisión de Clemmons y Van Wyk 1981).

Las somatomedinas son producidas por el hígado estimulado por la hormona de crecimiento hipofisaria (Binoux, Lassarre y Hardouin 1982).

Los primeros estudios sobre las somatomedinas demostraron un efecto estimulante sobre la incorporación de sulfato a los proteoglicanos del cartílago in vitro y un efecto mitogénico sobre diversos tipos celulares (Clemmons y Van Wyk 1981).

La primera evidencia directa de la estimulación del crecimiento in vivo por una somatomedina pura es debida a Rothstein et al. (1980), quienes han demostrado que la administración de Somatomedina C a sapos hipofisectomizados estimula la síntesis de DNA y la mitosis en las células del cristalino.

En diversos trabajos d'Ercole y Underwood (1980) han estudiado el papel de la somatomedina C en el control del crecimiento fetal del ratón, habiendo probado que la somatomedina C es producida por explantes de tejidos fetales y que existen receptores para dicho factor en las membranas celulares de la placenta y de diversos tejidos del cuerpo fetal. Sin embargo, la medición de las concentraciones de la somatomedina C en el suero materno en distintos momentos del desarrollo del ratón no proporciona una imagen sencilla, ya que no se observa correlación positiva entre los niveles circulatorios y el crecimiento fetal. Los autores sugieren que probablemente los efectos estimulantes de la somatomedina C son ejercidos en o cerca del lugar de producción, siendo, por tanto, irrelevantes

las concentraciones séricas de dicho factor.

En relación al crecimiento postnatal, un trabajo reciente (Schoenle et al. 1982) demuestra el efecto estimulante y dependiente de la dosis de la somatomedina IGF I sobre el crecimiento de ratas hipofisectomizadas.

La implicación de las somatomedinas en el control del crecimiento del embrión de pollo no ha sido estudiada directamente. Varios trabajos indican, sin embargo, la necesidad del lóbulo anterior de la hipófisis para el crecimiento global del cuerpo y de diversos órganos, pero no puede sacarse una conclusión definitiva sobre la importancia de la hormona de crecimiento.

La hipofisectomía por decapitación parcial del embrión reduce significativamente el crecimiento global, el del esqueleto (Betz 1970 y Thommes, Hajek y McWhinnie 1973), el del intestino delgado (Yeh, Kwo-Yih y Moog Florence 1975 a) y el del hígado, mientras que aumenta el del bazo (Betz 1970). El trasplante de lóbulo anterior de la hipófisis a la membrana coriolantoidea corrige totalmente los defectos en el crecimiento global y esquelético y parcialmente el defecto de crecimiento del hígado (Betz 1970 y McWhinnie y Thommes 1973). El crecimiento del intestino delgado en los animales hipofisectomizados puede ser parcialmente corregido por la tiroxina y la cortisona, pero no por la hormona de crecimiento (Yeh, Kwo-Yih y Moog Florence 1975 b).

La importancia fisiológica de otros factores de crecimiento es desconocida. Sin embargo, la presencia de receptores para el EGF ha sido comprobada en tejidos fetales del ratón (Adamson, Deller y Warshaw 1981). Además, durante la regeneración hepática en la rata, el número de receptores para el EGF disminuye, probablemente a causa de una intensificación del proceso de internalización (Earp y O'Keefe 1981), lo cual unido al hecho de que el EGF es capaz de estimular la síntesis de DNA en los hepatocitos *in vitro* (Richman et al. 1976) e *in vivo* (Bucher, Patel y Cohen 1978) sugiere que dicho factor de crecimiento es responsable, al menos en parte, del control de la proliferación celular durante la regeneración hepática.

La síntesis de los diferentes datos sobre los factores reguladores de la reproducción de un tipo celular determinado y la construcción de un modelo de regulación cuyas hipótesis puedan ser probadas experimentalmente es un objetivo que empieza a ser alcanzable en algunos casos. Así, Leffert et al. (1979) intentan una aproximación de esta clase al viejo problema del control humoral de la Regeneración hepática.

Basándose en la revisión de datos sobre la regeneración hepática y en los más recientes estudios sobre la proliferación de cultivos hepatocelulares, realizados en gran parte por los propios autores, intentan dar respuesta a cinco preguntas principales :

- 1ª- ¿ Qué factores circulantes controlan la regeneración hepática ?
- 2ª- ¿ Cuáles son las fuentes de los factores u hormonas que controlan la regeneración ?
- 3ª- ¿ Qué controla los niveles hepáticos de las hormonas reguladoras de la regeneración ?
- 4ª- ¿ Cómo podrían interactuar la Insulina, el Glucagón y el EGF para estimular la regeneración hepática ?
- 5ª- ¿ Qué mecanismos son regulados por la Insulina, el Glucagón y el EGF en relación al control de la regeneración ?

Diversas evidencias experimentales tanto in vivo como in vitro (cultivos hepatocelulares) permiten suponer que el control de la regeneración hepática depende de varios factores humorales. El papel principal corresponde probablemente a la Insulina, el Glucagón y el EGF como factores de control positivo. Otros factores necesarios para la estimulación son el ión calcio y los aminoácidos. La tiroxina, la triyodotironina y la hormona paratiroidea son necesarias in vivo. Los glucocorticoides tienen probablemente algún papel, pero su efecto sobre la proliferación de los cultivos hepatocelulares puede ser estimulante o inhibidor según la concentración y momento en el que son añadidos. La posibilidad de un control negativo ha sido afirmada y puesta en duda repetidamente, aunque parece indudable la existencia de factores polipeptídicos inhibidores de la reproducción hepatocelular (véase páginas anteriores). Para Leffert,

la Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) podría desempeñar el papel de factor de control negativo en la regeneración hepática, ya que su concentración en el suero disminuye rápidamente después de la hepatectomía parcial y presenta un efecto inhibitor sobre la proliferación de cultivos de hepatocitos fetales, además los hepatocitos adultos in vitro producen menos VLDL durante la fase de crecimiento logarítmico que durante la fase estacionaria.

De los tres factores principales mencionados, dos son de origen pancreático (Insulina y Glucagón) y con respecto al EGF únicamente sabemos que está concentrado principalmente en la glándula submaxilar y en las glándulas de Brunner del duodeno, tanto en los roedores como en el hombre. El EGF, cuyo peso molecular es de 6.100 daltons, está asociado a una proteína de 29.300 daltons que tiene actividad arginil-esterasa, siendo dicha actividad enzimática necesaria para la liberación del péptido activo.

Los niveles hepáticos de los factores reguladores dependen de la concentración de los mismos en la circulación general, del flujo sanguíneo hepático y de la capacidad de captación de los mismos por el hígado. El flujo sanguíneo hepático aumenta en un 100 % después de la hepatectomía parcial. La concentración en sangre portal del Glucagón aumenta, mientras que la de la Insulina disminuye. Los niveles plasmáticos de EGF a la hora y a las 24 horas de la hepatectomía parcial están disminuidos, aunque esto no descarta la posibilidad de elevaciones transitorias entre estos tiempos. La captación hepática de la Insulina y del Glucagón aumenta después de la hepatectomía, pudiendo ello ser debido a modificaciones del receptor correspondiente, a una disminución de la degradación o a un aumento de la internalización.

La interacción entre la Insulina, el Glucagon y el EGF en relación al estímulo de la proliferación hepatocelular ha sido aclarada en experimentos in vitro. El EGF actuaría como señal de iniciación del proceso de activación y posteriormente sería potenciada por la Insulina y el Glucagón. Además durante las primeras doce horas del estímulo inicial,

es decir, del cambio del medio de cultivo por medio fresco con los factores estimulantes, la respuesta proliferativa puede ser inhibida por la VLDL.

Sobre los mecanismos intracelulares controlados por la combinación de factores hepatotróficos no existe todavía una hipótesis definida. El problema del segundo mensajero de la Insulina y del EGF no está aclarado. Probablemente el factor fundamental en ambos casos es la activación de una Proteinkinasa de la membrana celular (Cohen 1982). No parece probable, por otra parte, que la internalización del complejo hormona-receptor sea necesaria para la estimulación de la síntesis de DNA.

Whitfield et al. (1976 y 1979) han descrito modificaciones en los niveles intracelulares de AMP cíclico después de la hepatectomía parcial, que podrían venir determinados por cambios de los niveles sanguíneos de Glucagón y Epinefrina. De las dos ondas de acumulación de cAMP observadas por estos autores (a las 4 y a las 12 horas posthepatectomía) la segunda es imprescindible para la iniciación de la síntesis del DNA.

Entre los múltiples cambios intracelulares que se producen en las 15 horas que preceden a la iniciación de la síntesis de DNA después de la hepatectomía parcial, Whitfield et al. (1976 y 1979) suponen que la elevación hacia las 12 horas posthepatectomía de la concentración intracelular de cAMP y de ión Calcio, esta última probable aunque no directamente demostrada, constituyen una doble señal desencadenante de la síntesis de DNA.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el papel del cAMP en el control de la proliferación hepatocelular no está aclarado ya que los estudios realizados con hepatomas no proporcionan una imagen coherente. Van Wijk et al. (1973) estudian los efectos del dibutiril-cAMP sobre la actividad proliferativa *in vitro* de las células de hepatoma Reuber H35 y encuentran una inhibición de la progresión de la síntesis de DNA (alargamiento de la fase S). Pastan, Johnson y Anderson (1975) revisan diversos trabajos sobre el tema y concluyen que los ensayos sobre contenido de cAMP en hepatomas *in vivo* han dado resultados contradictorios, no siendo

posible, por ahora, establecer una relación general válida entre el cAMP y el crecimiento de los hepatomas.

Puede concluirse que el control de la regeneración hepática y probablemente del crecimiento del hígado durante el desarrollo embrionario y postnatal dependen de una combinación característica de hormonas y factores de crecimiento más que de un único factor específico. Es posible que la combinación de factores reguladores incluya uno o más inhibidores además de los estimulantes.

A nuestro modo de ver, un modelo de retroalimentación negativa como el de Weiss y Kavanau (1957) sigue siendo aplicable al control de la proliferación hepatocelular, aunque con las necesarias adaptaciones a la complejidad de la situación real. El elemento de retroalimentación negativa no estaría constituido por un único inhibidor específico producido por los propios hepatocitos, sino por uno o más inhibidores difusibles y el conjunto de los sistemas de internalización y degradación lisosómica de los factores y hormonas circulantes de acción estimuladora. En la medida en que las señales de control positivo son consumidas y destruidas por las propias células receptoras, la actividad degradadora, que es proporcional al número de células, es formalmente idéntica al inhibidor propuesto en el modelo. En cuanto al mecanismo de acción de los factores inhibidores propiamente dichos una hipótesis de trabajo que nos parece adecuada consiste en suponer simplemente que los factores inhibidores son de estructura semejante a los estimuladores y que compiten con ellos para unirse al receptor, de modo que la unión inhibidor-receptor no sea capaz de desencadenar los cambios metabólicos que se producen como consecuencia de la unión estimulante-receptor.

Es importante tener en cuenta, además, que el control de la proliferación celular no es únicamente un problema de niveles circulantes de hormonas y factores de crecimiento, sino también un problema de geometría celular y del tejido. La implicación de la "geometría del tejido" en relación a la difusión de factores reguladores ha sido ya comentada .

La relevancia de la forma celular para la proliferación ha sido demostrada

por Folkman y Moscona (1978), quienes en cultivos en monocapa han conseguido diversos grados de aplanamiento celular, modificando la adhesividad célula-sustrato y han podido observar que, en células normales la forma celular está estrechamente acoplada al crecimiento y reproducción : Cuanto más aplanadas y adheridas al sustrato sólido están las células más intensa es su actividad proliferativa. Esta dependencia de la forma celular diferencia a las células normales de las células transformadas en relación al control del crecimiento y la proliferación, y proporciona una explicación común de los fenómenos de inhibición por contacto y de crecimiento dependiente de la adhesión (anclaje) al sustrato sólido.

Otro aspecto de la adhesión celular es el del posible efecto sostenido de los factores de crecimiento unidos al sustrato sólido en los cultivos o a la matriz intercelular in vivo. En efecto, Smith et al. (1982) han demostrado que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) se adhieren a las placas de cultivo recubiertas o no con colágena y que el PDGF inmovilizado de esta forma sigue siendo activo.

Finalmente, la importancia de la inervación para el control de la proliferación celular en órganos glandulares está en algún caso claramente demostrada, así, por ejemplo, en las glándulas salivales, la inervación simpática y parasimpática no solamente regula la secreción sino también el crecimiento del órgano (Schneyer 1972). En cambio, en el caso del hígado su importancia es probablemente mucho menor, ya que los numerosos experimentos de parabiosis, autotransplante heterotópico y derivación de la circulación portal indican claramente que en el control de la regeneración hepática los factores humorales circulantes desempeñan el papel fundamental (Siegel 1972).