

En el futuro de todos!

RELOJ CITOPASMÁTICO Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO: UN MODELO CON FUTURAS APLICACIONES MEDICAS Y COMERCIALES.



Omar Camargo

MVZ MSc. Profesor Asistente ISER, Pamplona

RESUMEN

El ciclo meiótico en los mamíferos comienza en el ovario fetal, prosigue hasta el estado de diplotene de la primera profase, y se detiene, poco antes del nacimiento en una fase similar a G2. La reiniciación de la meiosis, la cual ocurre inmediatamente antes de la ovulación, representa la transición entre las fases G2 y M del ciclo celular.

Una vez ovulado y fertilizado el oocito es activado, fenómeno que le da la capacidad para iniciar el clivaje el cual consiste en rápidas alteraciones de los estados de interfase y de mitosis. Se ha sugerido que un "reloj ordenador" controla el clivaje post-cigótico en virtud a que estas divisiones son relativamente rápidas, sincrónicas y no dependen del crecimiento celular. Aunque varios componentes de este reloj se han descubierto, los elementos que determinan su ciclicidad no han sido identificados. El reloj, se caracteriza por la actividad del factor promotor de la fase M (FPM), una cinasa dependiente de ciclinas, que cuando se activa induce la célula a la mitosis. De otro lado, se ha hallado que aumentos periódicos de la concentración de calcio libre citosólico ($[Ca^{++}]$) contribuye a la regulación de los ciclos celulares. Aunque el grado de regulación ejercido por dichas oscilaciones de $[Ca^{++}]$, no se conoce con certeza, se ha sugerido que el mecanismo que las controla es un componente fundamental del gran reloj ordenador.

Aquí exploramos las posibles interacciones que pueden existir entre Ca^{++} y el FPM, cómo estas regulan los ciclos celulares durante el desarrollo embrionario temprano (post-cigótico) y qué aplicaciones médicas y comerciales se han derivado de su estudio.

Palabras claves: ciclo celular, ciclinas, cinasas- fosfatasa, activación, desarrollo temprano.

INTRODUCCION

El principio de la enucleación de un oocito para que su citoplasma sirviera como receptor de un núcleo proveniente de una célula de otro embrión -clonación- fue postulado por el embriólogo alemán Hans Speman en 1938,

quien la describió como "una experiencia fantástica". Lo hacía con el fin de verificar la hipótesis de que una célula embrionaria contiene todas las instrucciones para desarrollarse como un individuo completo⁽¹²⁾.

La hipótesis fue probada por

primera vez en 1996, por el grupo encabezado por Wilmut y Campbell, en ovinos. Este éxito fue posible gracias a los recientes estudios sobre la interacción del núcleo donado y el citoplasma receptor, después de la reconstrucción del embrión⁽⁴⁸⁾.

Trabajos como el de Masui y Market en 1971⁽²⁶⁾, en los cuales se halló que la maduración del oocito es un proceso exclusivamente citoplasmático, abrieron el camino a una serie de investigaciones que condujeron a descubrir que el denominado factor promotor de la maduración (FPM) no solo promueve la maduración sino que también juega un papel clave en la regulación de los ciclos celulares mitótico y meiótico⁽²⁹⁻³⁰⁾.

En células embrionarias, contrariamente a lo que se registra en células somáticas, el progreso del ciclo celular es regulado por el estado del citoplasma. Reacciones puramente citoplasmáticas periódicamente aumentan y disminuyen la actividad del FPM y conducen al núcleo, esté listo o no, a iniciar y finalizar el ciclo mitótico⁽²²⁻³⁰⁾.

El FPM está compuesto de dos subunidades, una de las cuales es el producto del gen *cdc2*, una proteína con una masa molecular relativa de 34.000, conocida como $p34^{cdc2}$, presente en todas las especies estudiadas hasta hoy, desde la *Schizosaccharomyces pombe*, levadura en la cual se descubrió, hasta el hombre^(6,27). La otra subunidad es otra proteína que se acumula durante la

interfase y declina durante la mitosis: la ciclina^(7,27). Las dos subunidades deben estar unidas y fosforiladas en ciertos residuos de aminoácidos para que el FPM (heterodímero p34^{cdc2}+ciclina) sea funcionalmente activo^(13, 15, 37, 45).

En oocitos maduros su "reloj" se encuentra detenido en metafase de la meiosis II, a causa de la proteína producto del gen c-mos, conocida como factor citostático (FC) por evitar la degradación de las ciclinas y mantener así activo el FPM⁽²⁹⁻⁴⁵⁾. El factor citostático -FC- se inactiva a causa del aumento del $[Ca^{++}]_i$ inducido por la fertilización, el cual libera el mecanismo proteolítico que degrada las ciclinas, conllevando por lo tanto a la caída en la actividad del FPM que se traduce en la finalización de la meiosis y la entrada a la interfase del primer ciclo celular mitótico en la vida de un individuo. Al final de cada interfase la actividad del FPM aumenta, iniciando una cascada de reacciones que finalizan con la desintegración de la membrana nuclear, la condensación cromosómica y el ensamble del huso mitótico, es decir, conduce la célula a la mitosis para luego, en la medida en que la ciclina se degrada, volver a entrar a interfase^(3,23, 29, 31, 38).

A raíz de los hallazgos anteriormente señalados, se sugirió que los ciclos celulares en los estadios tempranos del desarrollo embrionario, son controlados por un oscilador bioquímico del cual el FPM sería el constituyente principal. No obstante, que un proceso dependiente de aumentos en los niveles de $[Ca^{++}]_i$, estaría

regulando las oscilaciones del FPM^(17, 23, 42, 46). Esta tesis se apoya, entre otras evidencias en el hecho de que uno de los rasgos más notorios que caracterizan a los oocitos de mamíferos es que su sensibilidad para liberar calcio de sus depósitos internos en respuesta a la fertilización, va aumentando en la medida en que estos maduran, haciéndose máxima justo antes del momento óptimo de la fertilización^(2, 5, 9, 16).

Adicionalmente, se ha hallado que las ondas de calcio observadas en el oocito recién fertilizado, inducidas por un factor proteico presente en el espermatozoide -la oscilina-⁽³⁶⁾, están altamente correlacionadas con el éxito del desarrollo embrionario post-fertilización^(4, 18, 34). Lo anterior nos permite clasificar a la "oscilina" dentro de los factores extragenómicos de origen paterno asociados al desarrollo embrionario temprano, los cuales cada día cobran mayor importancia en el campo de la reproducción asistida.

EL FPM

Cuando las ranas hembras se estimulan apropiadamente, se produce secreción de progesterona por parte de las pequeñas células que rodean el oocito. Esta hormona actúa sobre el oocito, induciendo la desintegración de la membrana nuclear, la condensación de los cromosomas y el ensamble del huso meiótico I. El proceso culmina con la formación del primer cuerpo polar, el ingreso del oocito a meiosis II y la detención de su ciclo celular en metafase de la meiosis II. Este último evento se atribuye al

producto del gen c-mos conocido como factor citostático (FC). Con tales características se ovulan los oocitos. La fertilización libera los mismos de ese "freno meiótico", permitiéndoles pasar a la anafase de la meiosis II, formar el segundo cuerpo polar y entrar en la interfase previa al primer ciclo mitótico. El proceso que permite a los oocitos totalmente desarrollados fertilizarse se denomina maduración meiótica y comenzó a estudiarse *in vitro* por la adición de progesterona a oocitos quirúrgicamente extraídos de ranas hembras del género *Xenopus laevis*⁽²⁹⁻³⁰⁾.

Todo lo anterior se inició con los trabajos de Masui y Market en 1971⁽²⁶⁾, quienes estimularon con progesterona oocitos inmaduros extraídos de rana (*Xenopus laevis*) e indujeron en ellos la maduración. Parte del citoplasma ($\approx 5\%$) de los oocitos así madurados se extrajo e inyectó en oocitos inmaduros. Los oocitos receptores maduraron como si hubieran sido tratados con progesterona y se utilizaron como donantes de citoplasma para un tercer grupo de oocitos inmaduros, los cuales a su vez maduraron y sirvieron como donantes citoplasmáticos para obtener un cuarto grupo de oocitos maduros. Con estas transferencias sucesivas se demostró que cualquier factor que estuviera promoviendo la maduración, era un componente del oocito no fertilizado más que un efecto de la progesterona con la cual se maduró la primera cohorte de oocitos. El factor que induce la maduración se denominó "factor promotor de la maduración" (FPM).

DNA y la duplicación de los centrosomas son también una consecuencia de la inactivación del FPM. En los ciclos celulares de células somáticas, estos dos últimos eventos son consecuencia de una transición adicional del ciclo celular llamada Start, que se registra durante G1, después de la inactivación de FPM⁽²⁹⁾.

En 1.983, Evans y cols⁽⁷⁾, midiendo la cantidad de proteínas sintetizadas durante los dos primeros ciclos celulares en huevos de erizo de mar, descubrieron que la cantidad de éstas, aumentaba linealmente después de la fertilización, sin embargo, ciertas proteínas se comportaban totalmente diferente: desaparecían abruptamente al final de cada mitosis y luego reaparecían gradualmente durante la siguiente interfase. El comportamiento cíclico de estas proteínas, desde entonces llamadas ciclinas, sugirió un simple modelo con tres predicciones probables:

- 1) las ciclinas son proteínas que activan FPM o hacen parte de él,
- 2) las células deben acumular ciclinas para entrar a la mitosis y
- 3) las células deben degradar las ciclinas para salir de mitosis.

La investigación en torno al FPM aumentó exponencialmente durante los años '80s conduciendo a la identificación del primer componente del FPM. Células de levaduras mutantes, con incapacidad para realizar mitosis, lograron dividirse con la ayuda de un ADNc obtenido de células de mamífero que codificaba para la proteína p34^{cdc2}⁽²²⁾. La proteína de 34 KDa, producto del gen cdc2 (p34^{cdc2}) fue reconocida en el FPM por medio de un

anticuerpo dirigido contra ella. El segundo componente del FPM identificado por Minshull y cols, en 1.989⁽²⁷⁾, resultó ser una ciclina. Después de tratar extractos del ciclo celular de oocitos de rana con sondas antisentido contra los ARNm de las ciclinas B-1 y B-2, se inhibió la capacidad inicial de dichos extractos para inducir el ciclo celular y por tal hecho concluyeron que la síntesis de ciclinas B es esencial para la activación del FPM. Las ciclinas asociadas al FPM pertenecen a la clase de ciclinas mitóticas, las cuales aumentan durante la mitosis.

En conclusión, mientras que la cinasa p34^{cdc2} es constante en su concentración la ciclina tiene un comportamiento periódico, se acumula durante la fase S, se degrada durante la fase M.

Actualmente se ha establecido que el heterodímetro p34^{cdc2} - ciclina es una proteína cinasa que cuando se activa fosforila una variedad de proteínas e induce mitosis en células en todas las especies estudiadas desde levaduras hasta humanos⁽⁶⁾. Entre las principales proteínas sobre las cuales actúa el FPM activado están: la histona H1, lo cual conlleva a la condensación de los cromosomas^(10,14), las láminas, por lo cual se produce la despolimerización de la membrana nuclear⁽³¹⁾, la ARN polimerasa, por lo cual se inhibe la transcripción característica durante la mitosis⁽³⁾ y la subunidad regulatoria de la miosina citoplasmática, proteína que cuando se fosforila se inactiva y se incapacita para ejercer su función de ATPasa y dirigir los

filamentos de actina durante la división celular⁽³⁸⁾.

Con base en lo anterior, el nombre de factor promotor de maduración se ha cambiado a factor promotor de meiosis/mitosis⁽⁴⁵⁾, además se sigue reconociendo como "el mecanismo de control universal" que regula el comienzo de la fase M⁽³³⁾.

La p34^{cdc2} se dirige al núcleo después de su asociación con ciclina B la subunidad activadora⁽³⁷⁾, pero esa simple asociación no es por sí misma suficiente para la activación de su actividad cinasa⁽¹⁵⁾. La p34^{cdc2} tiene sitios de fosforilación o desfosforilación que son regulados por proteínas cinasas o proteínas fosfatasa, respectivamente⁽²⁹⁾. La p34^{cdc2} tiene un sitio de regulación positiva en la tronina de la posición 161 (T161) que es fosforilado por Cak (cdk-activating kinase) y dos sitios de regulación negativa; en la tirosina de la posición 15 (Y15) y la treonina de la posición 16 (T16) que son fosforilados por Wee 1. La inhibición ejercida por la fosforilación de estos dos últimos residuos aminoácidos es superada por la acción de la fosfatasa Cdc25, la cual, a su vez, se autoregula por fosforilación. Una retroalimentación positiva ejercida por la p34^{cdc2} activa, sobre Cdc25, estimula la activación del FPM, aunque no es claro aún como Cdc 25 se activa inicialmente⁽⁴⁵⁾.

Las cinasas y fosfatasas capaces de modificar p34^{cdc2} que inicialmente fueron identificadas por análisis genético en levaduras

(Wee 1, Cdc25) y en oocitos de rana (Cak), hoy se les conocen sus homólogos en mamíferos⁽⁴⁵⁾. La idea es, que solo desfosforilaciones estratégicas de los sitios de regulación negativa pueden permitir la activación de p34^{cdc2} en la mitosis, no obstante estar unida a las ciclinas. Esto ayuda a explicar por qué, a pesar de la acumulación gradual de las ciclinas durante G2, la actividad cinasa no aumenta abruptamente sino en mitosis. Las células salen de mitosis debido a que la actividad cinasa de la p34^{cdc2} cae rápidamente a causa de la destrucción proteolítica de las ciclinas⁽¹³⁾ (ver figura 2).

conjugación de ubiquitina a las ciclinas. La ubiquitinación de las mismas permite que sean reconocibles por una proteasa citosólica compleja⁽¹³⁾. El modelo postula que en células embrionarias, la ubiquitinación de las ciclinas es estimulada por el FPM y por lo tanto ocurre solamente durante la mitosis. Además, que durante la nueva síntesis de las ciclinas requeridas para la siguiente mitosis, se remueve la tirosina fosfatasa la cual impide que el FPM que nuevamente se forma, adquiera actividad.

Papel del calcio

En los vertebrados, los oocitos no fertilizados se detienen en la metafase de la meiosis II por efectos del FC el cual tiene un componente esencial producto del proto-oncogen c-mos. El FC evita la degradación de las ciclinas mediadas por las ubiquitinas y por lo tanto, la inactivación del FPM⁽⁴⁰⁾.

Universalmente, la liberación del calcio interno -[Ca⁺⁺]_i- hace parte del proceso de fertilización lo cual no es sorprendente ya que otros procesos celulares tales como la activación de linfocitos T o la proliferación inducida por los factores de crecimiento, utilizan esta vía⁽⁹⁾.

Durante la fertilización, en el momento de la fusión de las membranas, el espermatozoide introduce en el oocito un factor proteico inductor de las oscilaciones de Ca⁺⁺, denominado "oscilina" el cual induce a una serie de oscilaciones de Ca⁺⁺ características demostrables por incrementos periódicos en el calcio citoplasmático libre: [Ca⁺⁺]_i, los cuales actúan como una señal esencial para la activación del oocito, y el desarrollo embrionario en sus estados iniciales^(21,36,47). El patrón oscilatorio de esta señal universal es exclusiva de oocitos de mamíferos y puede llegar a durar

El modelo que postula la existencia de un reloj citoplasmático basado en el FPM podría resumirse así: Antes de la síntesis de ciclinas, la cantidad de pre-FPM es pequeña, pero a medida que las ciclinas se sintetizan, el pre-FPM aumenta hasta un nivel en el que eventualmente excede la habilidad de la Wee1 para inactivarlo. En este punto el FPM comienza a ejercer su actividad cinasa, activando Cdc25 e inactivando Wee 1, lo cual conduce a una activación rápida e irreversible de todo el FPM existente en la célula. Una vez activado completamente, el FPM activa la maquinaria de degradación de ciclinas, con la cual la célula sale de mitosis. la degradación de las ciclinas es el resultado de

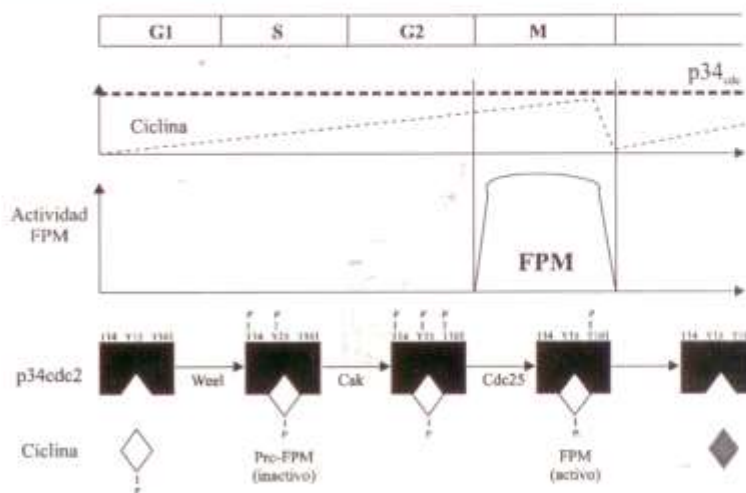


Fig. 2. Cambios moleculares del FPM durante el ciclo celular.

hasta 20 horas⁽⁹⁾. La activación del oocito conduce a la reanudación del ciclo celular y se asocia con un descenso en la actividad de la historia H1 cinasa^(10, 21, 36, 47).

La oscilina, es una proteína soluble del espermatozoide que existe como un oligómero con una subunidad de M_r 33 K y una localización intracelular específica en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide. Se caracteriza por la similitud con una hexosa fosfato isomerasa identificada en procariotes. Hasta ahora no se ha demostrado el papel de la hexosa fosfato proveniente del espermatozoide durante la fertilización, aunque una importante hexosa fosfato, el inositol 1, 4, 5 trifosfato ($InsP_3$), está bien caracterizada como segundo mensajero que moviliza calcio intracelular del oocito⁽³⁶⁾.

En los oocitos, como en la mayoría de las células somáticas, el Ca^{++} citosólico es aumentado por liberación del mismo a partir de los depósitos intracelulares en el retículo endoplásmico (RE). Son dos los tipos de canales de Ca^{++} propios de este RE: los receptores para inositol 1, 4, 5 trifosfato ($InsP_3R$) y los receptores ryanodina (RyR)^(20, 47). Estos receptores son sensibles a variaciones en las concentraciones de $[Ca^{++}]_i$ de modo que cuando la concentración descendiente estimula su apertura, mientras

las altas concentraciones cierran dichos canales. El efecto estimulante de las bajas concentraciones de Ca^{++} , causa el proceso de liberación de Ca^{++} inducido por Ca^{++} (LCIC). Este proceso de retroalimentación positivo conduce a un mecanismo regenerativo de liberación de Ca^{++} , el cual es responsable de que pequeñas variaciones de Ca^{++} sean amplificadas a oscilaciones globales y ondas de Ca^{++} . La sensibilidad de los canales de Ca^{++} para liberar el mismo se regula por la asociación con otras moléculas mensajeras tales como $InsP_3$ para $InsP_3R$ y ADP-ribose cíclica para los R y $R^{(2, 47)}$.

En los oocitos de mamíferos, la evidencia actual sugiere que la liberación de Ca^{++} en el momento de la fertilización proviene de la estimulación de $InsP_3R$ presentes sobre los depósitos de calcio. La evidencia más convincente de esto es el hecho de que un anticuerpo monoclonal (18A10) inhibidor de función, dirigido contra la región formadora de canales de los $InsP_3R$ tipo I de ratón, inhibe los picos de Ca^{++} inducidos por la fertilización en oocitos de hamster y de ratón⁽²⁸⁾. Sin embargo, teniendo en cuenta lo encontrado en otras especies de mamíferos, una completa inhibición de Ca^{++} es evidente cuando son inhibidos tanto los receptores $InsP_3R$ como los RyR ⁽²⁾.

Aunque la vía utilizada por el espermatozoide para iniciar las oscilaciones no ha sido identificada de manera precisa, se sugiere que al momento de la fertilización es activado un receptor de la membrana plasmática del oocito que podría estar acoplado a una proteína de unión a GTP (proteína G) o tener una actividad tirosina cinasa por la cual puede activar una fosfolipasa C (PLC) que a su vez estimula la producción de $InsP_3$, un agonista común liberador de $Ca^{++(9)}$.

Una clara demostración de que el sistema controlador de las señales de Ca^{++} es regulado durante el desarrollo está en el hecho de que la habilidad de los espermatozoides para inducir las oscilaciones de Ca^{++} depende del estado de maduración del oocito. Los oocitos inmaduros de ratón y hamster, en general presentan ondas de Ca^{++} más cortas, más lentas y a veces no visibles, comparadas con las ondas derivadas de oocitos totalmente maduros⁽²⁾. Además de estos cambios, Jones y Cols⁽¹⁶⁾, encontraron que los oocitos inmaduros generaron solamente hasta cuatro ondas de Ca^{++} comparadas con las 20-30 registradas en oocitos maduros.

Damiani y cols, en 1996⁽⁵⁾, evaluando la maduración citoplasmática y nuclear de oocitos obtenidos de terneras impúberes tratando de hallar una



posible causa de su baja competencia para el desarrollo encontraron que el proceso en general fue similar al registrado en los oocitos de animales adultos, sin embargo, las tasas de clivaje y desarrollo hasta blastocisto fueron menores. La evaluación de la maduración ooplasmática reveló que la mayoría de los oocitos provenientes de animales impúberes presentaron algún retardo en la migración y redistribución de las organelas después de la maduración.

La sensibilidad a la liberación de Ca^{++} mediada por $InsP_3$ que incrementa durante la maduración y se hace máxima en el estado de metafase II en oocitos de estrella de mar, ratón y bovino⁽²⁾. Esto parece ser debido a los aumentos en la cantidad de $InsP_3R$ y de Ca^{++} en los depósitos celulares así como también a los marcados cambios en la reorganización que sufre el RE durante la maduración⁽⁹⁾.

De acuerdo con los trabajos realizados por Ozil⁽³⁴⁾, pulsos repetidos de calcio pueden ser esenciales para el normal desarrollo de oocitos de mamíferos. En un estudio de activación partenogénica en conejos, en el que describió un método diseñado para imitar prolongadas oscilaciones de Ca^{++} , se indujeron incrementos repetidos en los niveles de Ca^{++}

mediante la aplicación de un pulso eléctrico de 1.8 kV/cm cada 4 minutos durante 1.5 horas. Los 22 pulsos aplicados condujeron a un significativo aumento de la tasa de desarrollo más allá del tercer ciclo celular, comparado con un solo pulso. Se concluyó que el proceso de activación no es un evento limitado en el tiempo y, por lo tanto, repetidos incrementos en $[Ca^{++}]_i$ pueden ser importantes para un desarrollo embrionario normal.

Además, en diferentes tipos de células, incluyendo células embrionarias de erizo de mar, ratón y fibroblastos, los picos de Ca^{++} durante la fase mitótica son evidentes⁽¹⁷⁾ sugiriendo un incremento en la sensibilidad para la liberación del Ca^{++} durante este período. El estroncio también causa la liberación de Ca^{++} específicamente durante la mitosis y no en la interfase del primer ciclo celular post-cigótico⁽¹⁹⁾.

Estudios en varios sistemas sugieren que estos picos de $[Ca^{++}]_i$ contribuyen al desarrollo mediante una regulación ejercida sobre el ciclo celular. No obstante, existe controversia al respecto. Una posibilidad sería que estas oscilaciones son esenciales y que el mecanismo que controla las variaciones citoplasmáticas de $[Ca^{++}]_i$ es un componente fundamental de ese gran reloj organizador (master clock)⁽⁴²⁾.

Elevaciones transitorias del $[Ca^{++}]_i$ se han estudiado ampliamente en ranas (*Xenopus*) y en erizo de mar, en donde el calcio oscila de una manera sinusoidal a períodos equivalentes a los de la división celular. Inicialmente se pensó que en ausencia de división celular las oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ cesaban, pero los experimentos del grupo de Keating en 1994, usando la sustancia quimioluminiscente aequorium sugieren que el $[Ca^{++}]_i$ oscila, aun si la división celular se bloquea. Además, debido a que las oscilaciones persisten en un medio libre de Ca^{++} , se postula que el oscilador es completamente endógeno⁽⁴²⁾.

En de erizos de mar, estudios con fura-2 se halló que los picos de $[Ca^{++}]_i$ aparecen en:

- 1) comienzo del ciclo celular, cerca de la transición G1/S.
- 2) durante el ingreso a la mitosis o en el momento de la desintegración de la membrana nuclear.
- 3) al final de la mitosis, cerca de la anafase y
- 4) durante la citocinesis.

La existencia de picos de $[Ca^{++}]_i$ que acompañan a los eventos de ciclo celular, no necesariamente implican que $[Ca^{++}]_i$ que acompañan a los eventos de ciclo celular, no necesariamente implican que $[Ca^{++}]_i$ está esencialmente involucrado. Pero experimentos de inyección y

fertilización indican que estas oscilaciones son esenciales para inducir a la transición entre las fases del ciclo celular. En particular, los picos de $[Ca^{++}]_i$ inducen tanto al comienzo como al final de la mitosis⁽⁴⁶⁾.

La inducción del punto start de la mitosis ha sido demostrada en varios sistemas. Han y col inyectaron blastómeros de *Xenopus* con 1) un anticuerpo dirigido contra fosfatidil - inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) el cual evitaría su hidrólisis catalizada por la fosfolipasa C y la subsecuente formación de $InsP_3$; 2) heparina, la cual compite con $InsP_3$ por los receptores $InsP_3R$ y presumiblemente inhibe la liberación de Ca^{++} inducida por $InsP_3$ y 3) el buffer de calcio dibromo - BAPTA. Cada una de estas inyecciones detuvo parcial o totalmente el ciclo celular⁽⁴²⁾.

En huevos de erizo de mar, inyecciones con $InsP_3$ o $CaCl_2$ inducen una desintegración prematura de la membrana nuclear (primer indicio de activación). Pero los huevos responden a estas señales sólo si la inyección se aplica por lo menos 45 minutos después del clivaje precedente y si la síntesis de proteínas no se inhibe⁽⁴³⁾. Además, la inyección de BAPTA o EGTA bloquean los aumentos del $[Ca^{++}]_i$ evitando la desintegración de la membrana nuclear y el comienzo de la mitosis. Estos

resultados sugieren que las oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ son esenciales para el ciclo celular y que ellas inducen la mitosis (activación de FPM)^(43, 46).

El FPM o histona H1 cinasa, dependiendo del estado de maduración del oocito, puede inactivarse mediante inyecciones de $InsP_3$ ⁽⁴⁷⁾ o mediante la inyección de $CaCl_2$ en mamíferos superiores⁽²⁴⁾.

¿Quién dirige a quién?

Evidencias a favor del calcio
¿Quién está corriente abajo en la cascada mediante la cual el $[Ca^{++}]_i$ induce una nueva mitosis? Al respecto Whitaker y cols⁽⁴⁶⁾ postularon a Camk II, una cinasa dependiente del complejo calcio - calmodulina, por que hallaron que activa Cdc25 in vitro, efecto que no se observó en las líneas celulares de mamíferos detenidas en G2 por tratamiento con un inhibidor de calmodulina.

Un papel fundamental del $[Ca^{++}]_i$ relacionado con la finalización de la meiosis se ha observado y consiste en una explosión del mismo al momento de la fertilización causando una reacción en cadena que se comienza con la inactivación del FC con lo cual se libera el mecanismo de degradación de las ciclinas y dado que las mismas son una parte fundamental del FPM, este se inactiva permitiendo al cigoto

entrar a la interfase de su primer ciclo mitótico⁽³⁰⁾.

Lorca y cols⁽²³⁾ en una serie de experimentos muestran que cuando las concentraciones de Ca^{++} libre aumentan en un rango fisiológico micromolar se desencadena un proceso dependiente de calmodulina que conlleva a la degradación de las ciclinas, esto a partir de extractos libres de células obtenidos de huevos detenidos en metafase de la meiosis II (extractos de FC). Por lo anterior, se ha sugerido que los picos de $[Ca^{++}]_i$ subsiguientes regulan los ciclos celulares post-cigóticos que dan origen al embrión, a través de la inactivación periódica del FPM.

Los mismos autores señalan que la activación de CamK II es una condición necesaria y suficiente para que el FC se inactive y para que se libere de su estado inhibido la maquinaria de degradación de las ciclinas. Describen también como inhibidores específicos de Camk II evitan la degradación de las ciclinas después de la microinyección de Ca^{++} e igualmente como en oocitos de rana no fertilizados, la inyección de CamK II constitutivamente activa, inactiva el FPM y el FC, aun en ausencia de oscilaciones de Ca^{++} . Se concluyó, por lo tanto, que la cascada mediante la cual el complejo calmodulina - calcio ejerce su acción pasa necesariamente a través de la proteína cinasa CamK II.

Aunque se conoce, como se mencionó anteriormente, que la destrucción rápida de las ciclinas inducidas por los aumentos de $[Ca^{++}]_i$ es ejecutada a través de una vía proteolítica en la cual intervienen las ubiquitinas, los que no se conocen exactamente son los mecanismos moleculares mediante los cuales CamK II induce la inactivación del FPM y del FC, y la relación entre estos dos (ver figura 3.)⁽²³⁾.

Evidencias a favor del FPM

Numerosos estudios atribuyen el control del ciclo celular a la cinasa p34^{cdc2} dependiente de ciclinas. La actividad de p34^{cdc2} está determinada por varias enzimas regulatorias y por el nivel de ciclinas, el cual es máximo justo antes y durante la mitosis y cae rápidamente al final de la misma⁽²⁹⁾.

Gran parte de las investigaciones coinciden en señalar los componentes proteicos como únicos elementos que controlan las primeras divisiones post-cigóticas. Murria y Kischner⁽⁵⁾ han obtenido extractos de oocitos de rana en los cuales se registran múltiples ciclos celulares. Ellos mismos observaron que cuando ARNm endógeno se destruye, los ciclos cesan, sin embargo, si el ARNm de la ciclina se reintroduce, los ciclos se reinician. Esto sugeriría que la síntesis de ciclinas es esencial para que el

ciclo celular progrese y por otra parte la ciclina se considera el único componentes necesario para inducir división mitótica. Posteriormente, los mismos autores revelaron que una forma de ciclina resistente a la proteólisis, previene el final de la mitosis, lo cual indicaría que la destrucción de las ciclinas es igualmente esencial para la progresión del ciclo celular. Luca y Ruderman en 1989, desarrollaron un sistema libre de células a partir de embrionarias de rana que realiza uno o más ciclos de síntesis y destrucción de ciclinas. Ellos mismos probaron el efecto de una variedad de agentes sobre la destrucción de ciclinas, mostrando que la adición de 5mM de EGTA, un quelante de calcio efectivo, no afecta la periodicidad que exhibe la destrucción de las ciclinas, como tampoco lo hace la administración de 1mM de $CaCl_2$. Por otra parte, la introducción de un

buffer de calcio en embriones en división, si bien retarda, no detiene los ciclos celulares⁽⁴²⁾.

En conclusión, si se asume que el EGTA y el BAPTA evitan los aumentos de $[Ca^{++}]_i$ y que por el contrario la adición de $CaCl_2$ induce una elevación temporal de $[Ca^{++}]_i$, los resultados sugieren que la dinámica de las ciclinas (y del FPM) no son dependientes de calcio.

No obstante las evidencias anteriores, Swanson y cols.⁽⁴²⁾ sugieren que un oscilador de $[Ca^{++}]_i$ es un elemento periódico, esencial para el reloj ordenador del desarrollo embrionario. Exploran esta posibilidad acoplando el modelo basado en el oscilador de $[Ca^{++}]_i$ a un modelo que involucra las interacciones proteicas que gobiernan la actividad del FPM durante el ciclo celular en las primeras etapas del desarrollo

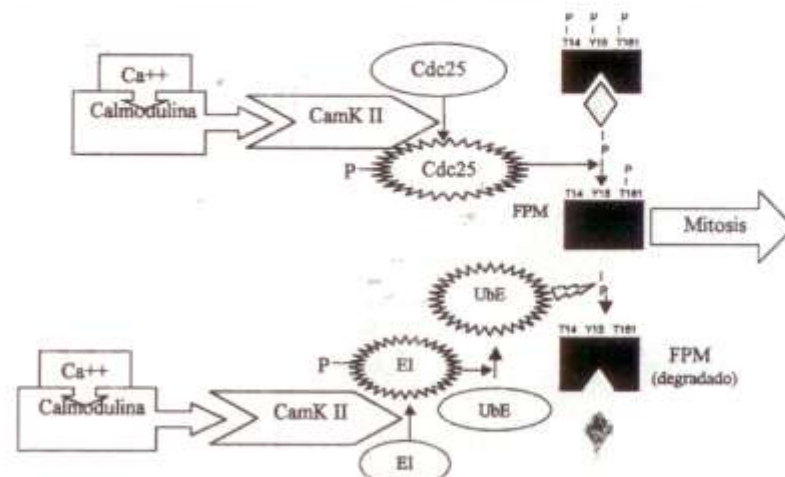


Fig. 3. Esquema del modelo en donde el complejo calmodulina/ Ca activan Cam K II para fosforilar y activar Cdc25 y la enzima intermediaria (EI) de la activación de las ubiquitinas (Ube).

embrionario. Ellos mismos proponen tres hipótesis relacionadas con estados dinámicos del sistema FPM y seleccionan los requisitos que serían necesarios para que se cumpla cada una. Para investigar cómo las dinámicas de $[Ca^{++}]_i$ pueden controlar las divisiones celulares en los primeros estados del desarrollo embrionario, los mencionados investigadores acoplaron el comportamiento del $[Ca^{++}]_i$ a manera de picos, que ocurre en erizos de mar y el comportamiento sinusoidal propio de las ranas, con los estados dinámicos hipotéticos del FPM. En la primera hipótesis, las oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ no alteran la autonomía del FPM. En la segunda y tercera hipótesis, donde el sistema FPM descansa en estados exitatorios y biestables respectivamente, las oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ conducen a la activación cíclica del FPM.

Los resultados de la simulación muestran que las hipótesis 2 y 3, indican que la maquinaria que regula el oscilador de $[Ca^{++}]_i$ (depósitos internos, receptores, canales, etc.) es un componente fundamental del gran reloj ordenador del desarrollo temprano. La maquinaria actuaría principalmente basada en el estado oscilatorio del $[Ca^{++}]_i$, cambiando el balance de cinasa a una actividad fosfatasa, de tal forma que el sistema FPM pasa de un estado estacionario a uno oscilatorio en el cual las pequeñas oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ controlan la frecuencia de la división celular.

Aplicaciones médicas y comerciales

Los hallazgos de que el oocito se prepara durante su maduración para responder al espermatozoide con oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ ayuda a explicar algunos casos de infertilidad humana. Recientemente se ha demostrado que alrededor del 20% de los oocitos aparentemente no fertilizados, los espermatozoides penetran pero se detienen en un estado temprano del proceso de fertilización⁽⁴⁴⁾. La detención en dicho estado puede deberse en parte, a factores derivados del padre tales como la oscilina⁽³⁶⁾, a anomalías en los centrosomas paternos⁽⁴¹⁾ o a anomalías en la maduración del oocito⁽³⁹⁾. En los tres casos el espermatozoide es incapaz de inducir las oscilaciones de $[Ca^{++}]_i$ con la consecuente inhibición de la activación del oocito y el fracaso del desarrollo postcigótico⁽²⁾.

Los datos inmunocitoquímicos han demostrado que la oscilina se concentra intracelularmente en el segmento ecuatorial de los espermatozoides de mamíferos, precisamente en la región en donde la membrana del espermatozoide se fusiona en el colema del oocito. De acuerdo con esta hipótesis, la difusión de oscilina al exterior del espermatozoide, después de la inyección intracitoplasmática (ICSI) podría ayudar a explicar el porqué esta técnica es más exitosa en promover el desarrollo de oocitos humanos comparada con la fertilización in-vitro (FIV). Adicionalmente, la reducida

reacción del anticuerpo monoclonal J4 contra la proteína de 34 Kda observada en hombres infértiles sugiere que la deficiencia de oscilina puede estar involucrada en algunos casos de infertilidad masculina⁽³⁶⁾.

La oscilina, que también ha sido hallada en espermatozoides murinos y porcinos, parece ser producida durante los estadios tardíos de la espermatogénesis ya que la inyección intracitoplasmática de espermátidas redondas no inducen la activación del oocito ni el desarrollo embrionario como si lo hacen los espermatozoides maduros cuando son inyectado a este (ICSI)⁽⁹⁾.

Por su parte; Collas y Robl⁽⁴⁾ buscando mejorar las tasas de éxito en la clonación de conejos por medio de la transferencia nuclear, utilizaron el modelo desarrollado por Ozil⁽³⁴⁾ basado en pulsos eléctricos para la activación. Los citados investigadores registraron un incremento significativo en las tasas de activación de oocitos recién ovulados (85% vs 3%) y de desarrollo hasta los estados de morula (72% vs 16%) y blastocito (48% vs 5%) después de múltiples pulsos en comparación con los que recibieron un solo pulso.

La clonación por medio de la técnica de transferencia nuclear representa un campo en el cual la relación núcleo - citoplasma ha cobrado una importancia fundamental⁽⁴⁸⁾. El desarrollo de embriones producidos por esta



técnica depende de las interacciones entre el núcleo donado - carioplasto - y el citoplasma receptor - citoplasto -. La actividad cinasa citoplasmática del FPM sobre la incidencia de los daños cromosómicos y aneuploidías observadas en dichos embriones ha hecho necesario desarrollar estrategias que prevengan tales daños. Entre aquellas pueden citarse principalmente: la transferencia del núcleo después en un momento de inactividad del FPM o la transferencia de núcleos diploides a citoplasmas en metafase II con un FPM activo. El objetivo; prolongar el período de exposición del núcleo al citoplasma lo cual daría tiempo al núcleo para reprogramarse⁽¹⁾.

Finalmente, dos aspectos de creciente interés relacionados con el tema abordado lo constituyen, por un lado los factores extragenómicos derivados del padre y relacionados con el desarrollo embrionario temprano, principalmente los centriolos⁽³⁵⁾ y por otro, la oscilina⁽³⁶⁾. De lo anterior surgen algunas preguntas:

¿Es el imprinting genómico el principal responsable de que los oocitos activados partenogénicamente (ginogenotes) no se desarrollen más allá del estado de blastocitos?

¿Qué tan limitante son los centriolos y la oscilina, por ejemplo, en el desarrollo temprano de un embrión producido parte

no genéticamente?

¿Qué tanto afecta el desarrollo post- cigótico la ausencia de oscilaciones de Ca^{++} ?

El segundo aspecto, tiene que ver con recientes hallazgos en donde se sugiere que los aumentos de Ca^{++} actúan tanto localmente en las sinapsis de las células nerviosas como distalmente en el núcleo para regular factores de transcripción y la expresión de ciertos genes. Además, se sugirió también que elementos regulatorios dentro de los genes responden diferencialmente, dependiendo de la diferencias espaciales en los aumentos de $[Ca^{++}]_i^{(8)}$.

¿Podrían estar sucediendo lo mismo en el oocito activado y el embrión?

BIBLIOGRAFIA

1. CAMPBELL K., LOI P., OTAEGUI P. and WILMUT I. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* 1996; 1:40-46.
2. CARROLLO J., JONES K. And WHITTINGHAM D. Ca^{2+} release and the development of Ca^{2+} release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Rev. reprod.* 1996; 1:137-143.
3. CISEK L. and CORDEN J. Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell- cycle control protein Cdc2. *Nature* 1989; 339: 679-684.
4. COLLAS R. and ROBL J. Factors affecting efficiency of nuclear transplantation in the rabbit. *Biol. Reprod.* 1990; 43: 877-884.
5. DAMIANI P., FISSORE R., CIBELLI J., LONG C., BALISE J. ROBL M. and DUBY R. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molec. Reprod. Devel.* 1996; 45:521-534.
6. DEKEL N. Protein phosphorylation / dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev. Reprod.* 1996; 1:82-88.
7. EVANS T., ROSENTHAL E., YOUNGBLOM J., DISTEL D. and HUNT T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33: 389-396.
8. FINKBEINER S. and GREENBERG E. Spatial features of calcium-regulated gene expression. *Bio Essays* 1997; 19: 657-660.
9. FISSORE RA. GORDO AC. And WU H. Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 1998; 49:43-52.
10. FISSORE R., LI HE C. and VANDE WOUDE F. Potential role of mitogen- activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1996; 55: 1261-1270.
11. GERHART J., WU M. and KIRSCHNER M. Cell dynamics of an M-phase - specific cytoplasmic factor in xenopus laevis oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* 1984; 98:1247-1255.
12. GILBERT SF. *Developmental Biology*. 4 ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts: 1994.
13. GLOTZER, MURRAY A. and KIRSCHNER M. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; 349: 132-138.
14. GURLEY L., D'anna J. BARHAM S. DEAVEN L. and TOBEY R. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem.* 1992; 84: 1-15.
15. JEFFREY P., RUSSO A., POLYAK K., GIBBS E., HURWINTZ J., MASSAGUE N. and PAVLETICH N. Mechanism of CDK activation revealed by structure of a cyclin A- CDK complex *Nature* 1995; 376: 313-320.
16. JONES K., CARROLL J., MERIMAN J., WHITTINGHAM D., and KONO T. Repetitive sperm- induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell- cycle dependent. *Development* 1995; 121: 3259-3266.
17. KAO J., ALDERTON J., TSIEN R. and STEINHARDT R. Active involvement of Ca^{2+} in mitosis progression of swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 1990; 111: 183-196.
18. KLINE D. Activation of the mouse egg. *Theriogenology* 1996; 45: 81-90.

19. KONO T., JONES K., BOS- MIKICHA. WHITTINGHAM D. and CARROLLO J. A cell cycle - associated change in Ca^{2+} releasing activity leads to the generation of Ca^{2+} transients in mouse embryos during the first mitotic division . *J. Cell Biol.* 1996; 915- 923.
20. LAI F., ERICKSON H., ROUSSEAU E., LUI Q. and MEISSNER G. Purificación and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988; 331: 315- 319.
21. LAWRENCE Y., WHITAKER M. and SWANN K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development* 1997; 124: 233- 241.
22. LEE M. and NURSE P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene. *Nature* 1987; 237: 31-35.
23. LORCA T., CRUZALEGUI F. FESQUET D., CADAFORE J. MERY J., MEANS A. And DOREE M. Calmodulin - dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature.* 1993; 366: 270-273.
24. MACHATY Z., FUNAHASHI H., MAYES M., DAY B. and PRATHER R. Effects of injectin calcium chloride into in vitro - matured porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 316-322.
25. MASUI Y. and CLARKE R. Oocyte maturation. *Inter. Rev. Cytol* 1979; 57: 185-282.
26. MASUI Y. and MARKET C. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 1971; 177: 129-146.
27. MINSHULL J. BLOW JJ. And HUNT T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell* 1992; 56: 947- 956.
28. MIYAZAKI S., YAZUKI M., NAKADA K., SHIRAKAWA H., NAKANISHI S., NAKADE S. and MIKOSHIBA K. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillations by antibody to the inositol 1, 4, 5 triphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 1992; 257: 251-255.
29. MURRAY A., and HUNT T. The cell cycle an introduction, 1st ed. 251 pp. W.H. Freeman & Co. New York; 1993.
30. MURRAY A. and KIRSCHNER M. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989; 339:275-280.
31. MYAKE - LYE R. and KIRSCHNER M. Induction of early mitotic events in a cell - free system. *Cell* 1985; 41: 165-175.
32. NEWOPORT JW. and KIRSHNER MW. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell* 1984; 37: 731-742.
33. NURSE P. Universal control mechanism regulating onser of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503-508.
34. OZIL J. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation . *Development* 1990; 109: 117-127.
35. PALERMO G., COLOMBERO L. And ROSENWAKS Z., The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev. Reprod.* 1996; 2: 19-27.
36. PARRINGTON J., SWANN K., SHEVSHENKO V., SESAY A. and LAI F. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 379: 364-368.
37. PINES J. and HUNTER T. Human cyclins A and B1 are differentially - located in the cell and undergo cell cycle - dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 1991; 115: 1-17.
38. SATTERWHITEL L., LOHKA M., WILSON K., SCHERSON T., CISEK L. and POLLARD T. phosphorylation of myosin - II light chain by cyclin -p34cdc2: A mechanism for the timing of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 1992; 118: 595-605.
39. SCHMIADI H. and KENTENICH H. Premature chromosome condensation after in vitro fertilization. *Human. Reprod.* 1989; 4: 689- 695.
40. SHIBUYA E. and MASUI Y. Molecular characteristics of cytostatic factors in amphibia egg extracts. *Development* 1989; 106: 799-808.
41. SIMERLY C., WU G-J., ZORAN S., et al. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule - organizing centre, in humans, and the implications for infertility. *Nature Medicine* 1995; 1: 47-52.
42. SWANSOS C., ARKIN A. and ROSS J. An endogenous calcium oscillator may control early embryonic division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 1194-1199.
43. TWING J., PATEL R. and WHITAKER M. Translation control of $InsP_3$ -induced chromatin condensation during the early cell cycles of sea urchin embryos. *Nature* 1988; 332: 366-369.
44. VAN BLERKOM J, DAVIS P. and MERRIAM J. A retrospective analysis of unfertilised and presumed parthenogenetically activate human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Human Reprod.* 1994; 9: 2381- 2388.
45. WHITAKER M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod.* 1996; 1: 127-135.
46. WHITAKER M. and PATEL R. Calcium and cell cycle control. *Development* 1990; 108:525-542.
47. WHITE K. and YUE C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes *Theriogenology* 1996; 45: 91-100.
48. WILMUT I, SCHNEIKE AE., McWHIR J., KIND AJ., and CAMPBELL KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 285: 810-813.