

# El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas

José Antonio Alvarado-Moreno y Héctor Mayani\*

Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México

Recibido en su versión modificada: 06 de julio de 2006

Aceptado: 01 de septiembre de 2006

## RESUMEN

*El ciclo celular constituye el conjunto de eventos que determinan la actividad metabólica de toda célula así como su división y la generación de células hijas. Este proceso está involucrado en todos los procesos celulares tales como proliferación y diferenciación. Se ha demostrado que diversos elementos moleculares participan en su regulación y que alteraciones en este proceso pueden conducir a trastornos fisiológicos e incluso a la muerte del organismo. En los mamíferos, uno de los tejidos con mayor recambio celular es el hematopoyético, por lo que se requiere un control muy estricto del ciclo celular, principalmente a nivel de células troncales y progenitoras para la óptima producción de células sanguíneas. En este artículo presentamos un panorama general de los principales mecanismos y factores involucrados en la regulación del ciclo celular, poniendo particular énfasis en su papel en la biología de las células hematopoyéticas primitivas.*

### Palabras clave:

*Ciclo celular, inhibidores del ciclo celular, hematopoyesis, células troncales, células progenitoras*

## SUMMARY

*The cell cycle comprises a group of biological events that determine the metabolic activity of any cell, as well as its division and the generation of new daughter cells. It is involved in every cellular process, such as proliferation and differentiation. It has been shown that several molecular elements regulate the cell cycle, and that alterations in any of its phases and/or regulators could give rise to physiologic deficiencies, and even death. In mammals, the haematopoietic tissue is one of the most active in terms of cell replacement; thus, a tight cell cycle control, particularly at the level of stem and progenitor cells is crucial for optimal blood cell production. In the present article, we give a comprehensive overview of the major mechanisms and regulatory molecules that participate in the cell cycle of mammalian cells, with particular emphasis on its role in the biology of primitive cells of the hematopoietic system.*

### Keywords:

*Cell cycle, inhibitors, haematopoiesis, stem cells, progenitor cells*

## Introducción

En 1838, Theodor Schwann y Jacob Schwann propusieron, mediante la teoría celular, que todos los organismos vivos se componen de una o más células que proceden de la división de células pre-existentes, con lo que afirmaban que la división celular en cierta forma es una ruta a la inmortalidad.<sup>1</sup> Las células se reproducen por la duplicación de su contenido genético y la división de su citoplasma; este ciclo de división celular es el medio fundamental por el cual todos los organismos vivos son propagados. En especies unicelulares como las bacterias y levaduras, cada división celular produce un organismo; en organismos multicelulares, múltiples ciclos de división celular son necesarios para generar un nuevo individuo y, posteriormente, necesarios para el mantenimiento de los individuos a lo largo de toda su vida.

En los mamíferos, uno de los tejidos con mayor recambio celular y, por ende, donde la división es más común, es el tejido hematopoyético. Todas las células de la sangre se forman a partir de la continua producción de células progenitoras que, a su vez, da lugar a células maduras. Así, nuestro organismo produce  $1 \times 10^{10}$  eritrocitos y  $4 \times 10^8$  leucocitos cada hora durante la etapa adulta.

El ciclo celular es sin duda uno de los procesos biológicos más intensamente estudiados, y a pesar de los grandes esfuerzos realizados, aún quedan incógnitas de cómo éste es controlado por las diversas moléculas que participan en él. En el presente artículo, haremos un análisis de los mecanismos que regulan el ciclo celular en general y posteriormente nos enfocaremos a las características particulares del ciclo celular en el proceso de formación de las células sanguíneas.

\* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr Héctor Mayani. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 México, D.F., México. Tel.: (52 55) 5627-6959, Fax: (52 55) 5761-0952. Correo electrónico: hmayaniv@prodigy.net.mx

## El ciclo celular

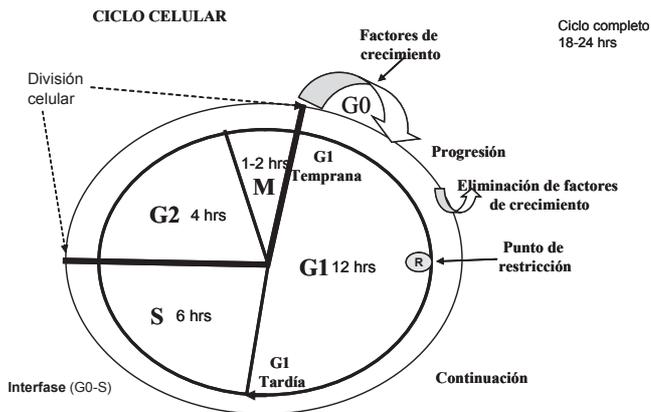
El ciclo celular es un término usado para describir una serie ordenada de eventos responsables de coordinar la duplicación del material genético y citoplásmico de una generación celular a la siguiente, y de asegurar la segregación balanceada del material genético en las dos células hijas. En células eucarióticas el ciclo celular se divide en cuatro fases basadas en eventos visibles o medibles, denominadas G1, S, G2 y M. Si durante la fase G1, las células están sujetas a estimulación por mitógenos extracelulares y factores de crecimiento, transitan en esta fase para proceder con la síntesis de ADN en la fase S; G2 es el intervalo entre la culminación de la síntesis de ADN y la mitosis (M). Esta última es visible al microscopio y comprende la citocinesis (división del contenido citoplásmico) y la cariocinesis (división del contenido cromosómico celular). Existe también un estadio denominado G0, el cual es usado para describir las células que han salido del ciclo celular y permanecen en un estado de quiescencia, no proliferativo (Figura 1). En G0, las células difieren mucho de las que se encuentran en G1; disminuye el tamaño celular debido a un desbalance entre la síntesis y degradación de los componentes celulares, además las enzimas y el transporte transmembranal son bajos. Las fases G1, S y G2, son imperceptibles a la vista y constituyen la etapa denominada interfase.<sup>2,3</sup> Sin embargo, la conservación de los procesos de crecimiento celular y división puede dissociarse, en casos especiales: por ejemplo, en los ovocitos, neuronas y células de músculo, puede existir crecimiento celular sin división celular y, en huevos fertilizados, puede existir división celular sin crecimiento celular; estos eventos pueden funcionar en forma independiente o complementaria.<sup>4</sup>

## Reguladores del ciclo celular

Para que se puedan llevar a cabo los diferentes eventos de la progresión del ciclo celular que alterna procesos de proliferación y procesos de diferenciación, es necesaria la participación de diversas moléculas que, junto con las condiciones del medio, controlan la duplicación celular. Tal es el caso de las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks). De acuerdo con las últimas versiones de los genomas de humano y de ratón, hasta el momento se conocen 11 genes que codifican para las Cdks y otros 9 genes que codifican proteínas con similitudes estructurales conservadas.<sup>5</sup>

### Cinasas dependientes de ciclinas (Cdks)

Las Cdks representan la subunidad catalítica de una gran familia de enzimas que promueven la fosforilación de residuos de serina/treonina; las holoenzimas están formadas por complejos heterodiméricos con una de varias subunidades reguladoras denominadas ciclinas, las cuales han sido implicadas en el control de la progresión del ciclo celular. El primer miembro de la familia de Cdks, que se describió ahora recibe el nombre de Cdk1 y fue identificado mediante un tamizaje genético en mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* y



**Figura 1.** El ciclo celular. El esquema muestra las diferentes fases del ciclo celular, y el tiempo promedio de cada una de las fases. Se observa como la presencia de factores de crecimiento inducen la progresión de las células en G0 a las siguientes fases del ciclo. La eliminación de estos puede mantener a las células en el punto R o regresar a G0.

*Sacharomyces cerevisiae* (Cdc2 y Cdc28 respectivamente), con defectos en la división del ciclo celular.<sup>6</sup> Este gen resultó ser equivalente a la subunidad catalítica p34 del factor inductor de la mitosis (FIM), identificado en *Xenopus laevis*, luego de la clonación de los miembros de esta familia. En 1991, en el Cold Spring Harbor Symposium on Cell Cycle, se decidió adoptar el término cinasas dependientes de ciclinas, de las que actualmente se conocen 11 miembros (Cuadro I).<sup>5</sup>

La actividad de las Cdks en el ciclo celular es un proceso altamente controlado a diferentes niveles; además de requerir subunidades activadoras (ciclinas), que también se unen a reguladores negativos inhibidores de Cdks o inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI) y adicionalmente están sujetas a regulación por fosforilación y desfosforilación de la subunidad catalítica. Las Cdks pueden ser fosforiladas en residuos de treonina (T172 en Cdk4 y T160 en Cdk2)

**Cuadro I. Complejos formados por las Cdks y las Ciclinas**

CDK	Ciclinas con que se asocia	Referencia
1	A1, A2, B1, B2, B3, F	Malumbres et al., 2005 <sup>7</sup> Conget et al., 2000 <sup>8</sup>
2	A1, A2, E1, E2 D1, D2, B1, B3	Aleemet et al., 2005 <sup>9</sup> Malumbres et al., 2004 <sup>10</sup>
3	E1, F2, A1, A2, C, D	Ren et al., 2004 <sup>11</sup>
4	D1, D2, D3	
5	p35, p39 (D-E y TIPO G)	Lilja et al., 2004 <sup>12</sup> Zhang et al., 2004 <sup>13</sup>
6	D1, D2, D3	
7	H	Lolli et al., 2005 <sup>14</sup>
8	C	Akoulitchev et al., 2000 <sup>15</sup>
9	K, T1, T2	Garriga et al., 2004 <sup>16</sup>
10	Factor Ets2	Kasten et al., 2001 <sup>17</sup>
11	L1, L2 (D)	Loyer et al., 2005 <sup>18</sup>

localizados en su asa "T" para llevar a cabo su propia actividad catalítica. Mientras que las cinasas Wee1 y Myt1 inhiben la actividad de cinasas de los complejos ciclinas-Cdks, por la fosforilación de residuos adyacentes de tirosina y treonina en la subunidad de Cdks. La fosfatasa Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C) activa estas cinasas al desfosforilar los residuos de amino ácidos (aa) fosforilados por las cinasas Wee1 y Myt1. De esta manera podemos ver que los complejos ciclina-Cdks requieren ser fosforilados en el asa "T" de la subunidad Cdk por la cinasa activadora de Cdks. Cuando ambas fosforilaciones, activadoras e inactivadoras existen simultáneamente en la misma molécula, las señales inhibitorias son dominantes y por lo tanto la cinasa carece de actividad, consiguientemente la fosfatasa Cdc25 es la responsable de la activación.<sup>4,19</sup>

### Ciclinas

Estudios realizados en huevos de erizo de mar identificaron una serie de proteínas que se sintetizan y se destruyen en cada una de las divisiones embrionarias las cuales recibieron el nombre de ciclinas.<sup>20</sup> Fueron subsecuentemente clonadas de embriones fertilizados de almejas y erizos de mar, y se observó que éstas promueven la meiosis en ovocitos de *Xenopus laevis*.<sup>21</sup> Proteínas relacionadas designadas como Cdc13, ciclina A y ciclina B fueron aisladas de *S. pombe*, *S. cerevisiae* y células humanas. Posteriormente, se demostró el establecimiento de interacciones específicas proteína-proteína entre la Cdk1 y las ciclinas A y B en ovocitos de almejas, estrellas de mar y *X. laevis*.<sup>22</sup> Asimismo, se descubrieron otras ciclinas en mamíferos por complementación de mutantes de *S. cerevisiae* y células B de linfomas.<sup>23</sup>

Actualmente y de acuerdo con el genoma humano, se han identificado, al menos, 29 genes que codifican proteínas relacionadas que comparten una región conservada de 150 residuos de aa designados "caja de ciclinas" (cyclin box). Este dominio está formado por 5 regiones helicoidales y es responsable de la unión de supuestas proteínas de acompañamiento incluyendo las Cdk (Cuadro I).<sup>5</sup>

De las 29 proteínas designadas formalmente como ciclinas, algunas no se asocian a Cdks o a otras cinasas, tal es el caso de las ciclinas F, G, I, J, M, O y S. Sin embargo, el análisis de la secuencia del genoma humano ha identificado 7 locis adicionales que codifican a supuestas ciclinas de acuerdo con la secuencia homóloga a la caja de ciclinas, no obstante, hasta el momento no se han descubierto sus funciones.

### Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI)

Los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI) juegan papeles clave en la regulación de la proliferación y el desarrollo celular, a través del control que ejercen sobre transiciones críticas del ciclo celular y como efectores de vías de transducción que actúan en puntos de control del ciclo celular (checkpoints). Su importancia se ha puesto de manifiesto al encontrar que formas deficientes de estos inhibidores se asocian con el desarrollo de tumores. Su actividad es

altamente controlada a través del ciclo celular y en respuesta a varias señales. Mientras que algunas de estas proteínas inhibitorias se expresan y funcionan de manera constitutiva como p16, otras como p27 se expresan en respuesta a condiciones del medio ambiente y detienen el ciclo celular de manera transitoria. La regulación generalmente afecta el nivel o la disponibilidad de los CDKI que pueden cambiar sus actividades intrínsecas. Los mecanismos que controlan la función de los CDKI incluyen: 1) regulación de la transcripción, 2) traducción y 3) proteólisis. Sin embargo, algunas señales cambian la capacidad de los CDKI para interactuar con sus blancos específicos.<sup>24</sup>

Los CDKI que gobiernan estos eventos han sido asignados a una de las dos familias basadas en su estructura y blancos de Cdks. La primera clase incluye a las proteínas INK4, las cuales son nombradas de esta forma por su capacidad de inhibir específicamente la subunidad catalítica de las proteínas monoméricas Cdk4 y Cdk6, formando complejos binarios y está formada por cuatro proteínas: p16<sup>INK4</sup>,<sup>25</sup> p15<sup>INK4</sup>,<sup>26</sup> p18<sup>INK4</sup>,<sup>27</sup> y p19<sup>INK4</sup>.<sup>28</sup> Las cuatro proteínas comparten una identidad de aproximadamente un 40% y bioquímicamente son muy similares.<sup>29,30</sup> No obstante, se sugiere que pueden tener un efecto inhibitorio formando un complejo ternario: INK4-Cdk4-ciclina D, con la unión específica a la holoenzima, bloqueando el complejo. Análisis estructurales de los complejos p16-Cdk6, p19-Cdk6 y p18-Cdk4 pudieron confirmar esto, ya que las proteínas INK4 se unen a regiones cercanas al sitio de unión de ATP del surco catalítico y opuesto al sitio de unión de ciclinas de las Cdk4 y Cdk6, induciendo un cambio conformacional que distorsiona la región catalítica y altera alostéricamente el sitio de unión de la ciclina D, favoreciendo su disociación.<sup>31</sup>

Para el caso de p16, el miembro prototípico de la familia, se ha demostrado que es un inhibidor específico de Cdk4.<sup>25</sup> Asimismo, es importante mencionar que la transcripción de p16 puede ser reprimida por la proteína del retinoblastoma (Rb).<sup>32</sup>

Los complejos ciclinas/Cdks pueden ser contrarrestados por inhibidores de acción más amplia que forman la segunda clase de CDKI, la familia Cip/Kip, cuyas acciones afectan las actividades de las Cdks asociadas a las ciclinas A, D y E. Esta clase está formada por las moléculas: p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>,<sup>33,34</sup> p27<sup>Kip135</sup> y p57<sup>Kip2</sup>.<sup>36</sup> Cada una de las cuales contiene regiones características en el amino terminal que aumentan la unión tanto a las ciclinas así como a las subunidades de Cdks.<sup>37,38</sup> Estas moléculas forman complejos ternarios con la ciclina B/CDC2, ciclina A/Cdk2, ciclina E-Cdk2, ciclina D-Cdk4 y ciclina D-Cdk6.<sup>39</sup>

Basados en un gran número de experimentos *in vitro* y en los estudios de sobreexpresión *in vivo*, se ha demostrado que los CDKI de la familia Cip/Kip, interfieren con las actividades de las Cdks asociadas a las ciclinas A, D y E. Trabajos más recientes han revelado que aunque las proteínas Cip/Kip son potentes inhibidores de la Cdk2 dependientes de las ciclinas E y A, también actúan como reguladores positivos de las cinasas dependientes asociadas a la ciclina D.<sup>19</sup>

La expresión de genes inhibidores individuales de Cdk, es regulada por diferentes señales antiproliferativas tales

como el daño al ADN por radiación ionizante, o la inhibición de la proliferación por la presencia del Factor de Crecimiento Transformante Tipo Beta (TGF-β). El factor de transcripción p53 activa la expresión de inhibidores como p21. Por otro lado, la función de Rb, reprime la transcripción de p16, y el TGF-β estimula la transcripción de p15.<sup>40</sup>

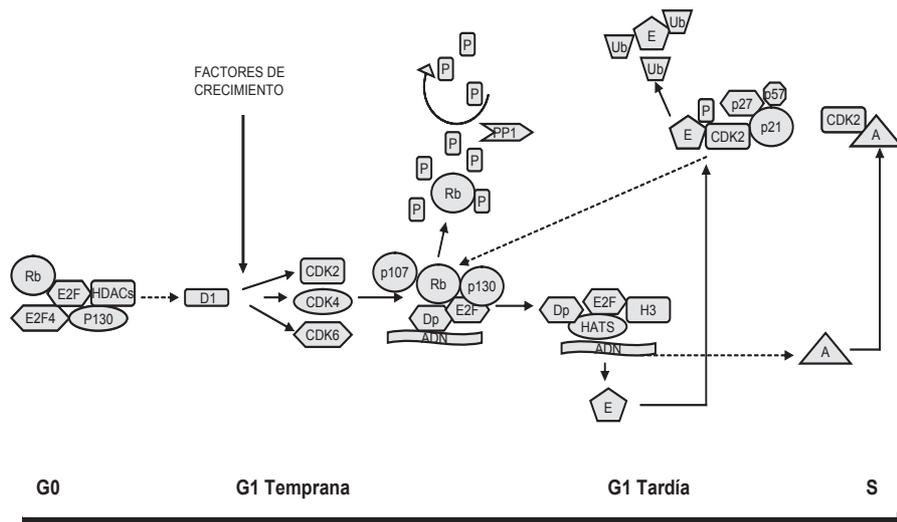
**El factor de elongación de la transcripción E2F**

E2F es un miembro representativo de una familia de factores de transcripción E2 (E2F) que actúan como efectores río abajo de la vía de Rb y juegan un papel importante en la división del ciclo celular.<sup>41</sup> Se consideran como reguladores positivos de genes requeridos para la síntesis de ADN, aunque también pueden funcionar como represores de la transcripción que actúa en la proliferación y en la diferenciación, como reguladores de la muerte celular, de la oncogénesis y la supresión de tumores.<sup>42</sup> En células de mamífero, la actividad de E2F se genera por una amplia gama de complejos interconectados en donde participan siete genes de E2F: dos genes DP (DP1 y DP2) y tres genes que codifican a las proteínas de la familia de Rb (Rb, p107 y p130). E2F1, E2F2 y E2F3 (E2F3a) (la cual difiere sólo en el amino terminal con el represor E2F3b) son potentes activadores transcripcionales, los cuales interactúan exclusivamente con Rb y se expresan frecuentemente durante el ciclo celular. E2F4 y E2F5 se expresan en algunos tipos celulares, se consideran pobres activadores de la transcripción y funcionan como represores, ya que reclutan a las proteínas asociadas a promotores reguladores de E2F. E2F4 puede interactuar con las tres proteínas pocket y E2F5 se puede unir a p130.<sup>43</sup> E2F3b es el complejo predominante E2F-Rb en algunos tipos de células quiescentes y funciona como un represor transcripcional.<sup>44</sup> Los miembros E2F6 (en altos niveles de expresión retrasa la re-entrada al ciclo celular y reprime los genes de respuesta a

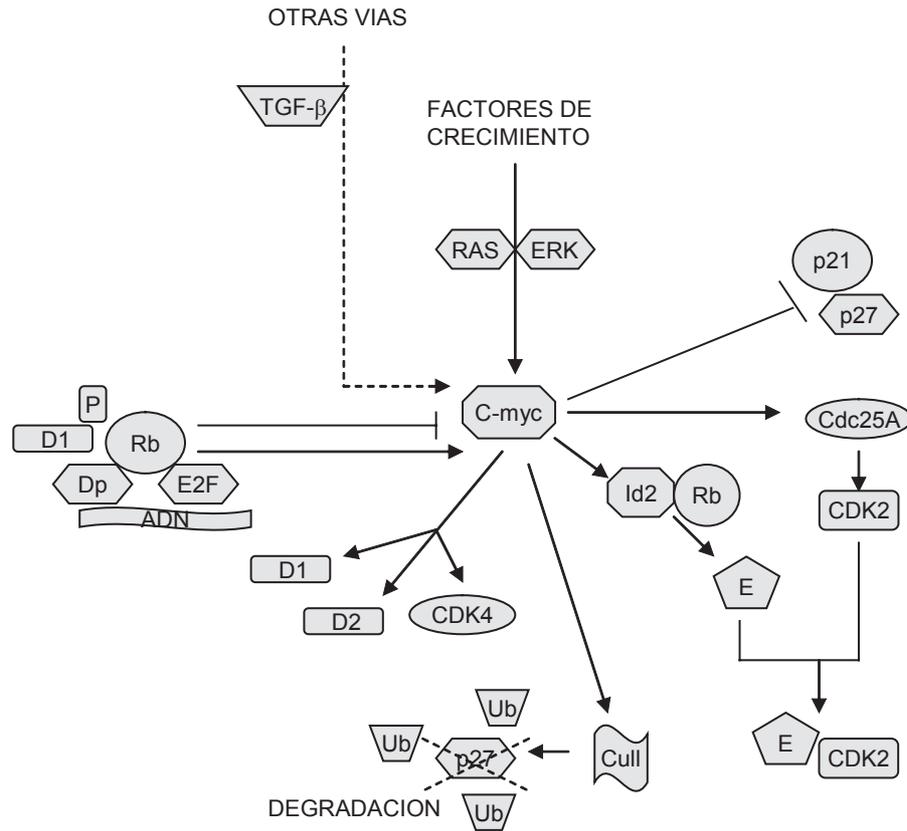
E2F) y E2F7 (se asocia con promotores de E2F durante las fases G2 y S del ciclo celular) que tienen truncado el dominio de unión a las proteínas “pocket” y a la transactivación; por lo que ellos bloquean la transcripción de forma independiente de las proteínas pocket.<sup>45</sup> Las proteínas presentan dos dominios de unión a ADN de forma independiente de DP, y los loci de E2F6 y E2F7 producen importantes RNAs con empalmes alternativos, los cuales codifican distintas isoformas de proteínas, ya que se han demostrado dos isoformas de E2F7 y dos y cuatro isoformas en humano y ratón de E2F6. La función más ampliamente estudiada y mejor entendida de E2F es su capacidad para regular la transición de G1/S y la entrada a la fase S durante el ciclo celular.<sup>46</sup> Cabe mencionar que se han identificado una gran variedad de proteínas virales entre las que destacan el antígeno T grande de SV40, y la proteína E6 del papiloma virus humano (HPV-16), que compiten con los miembros de la familia E2F por su sitio de unión en la proteína Rb. La sobre-expresión de estas proteínas virales da como resultado un exceso de formas libres de E2F y que favorecen la entrada a la fase S.

**La proteína del retinoblastoma (Rb)**

Rb es una proteína nuclear que pertenece a una familia de tres miembros como se mencionó anteriormente, los cuales presentan múltiples sitios que son fosforilados por las Cdk's (Figura. 2). Rb se mantiene mínimamente fosforilada (hipofosforilada) en células quiescentes o G0, pero cambia a un estado altamente fosforilado (hiperfosforilada) durante la progresión de G1 y se mantiene así hasta el final de la mitosis. Rb fosforilada libera al factor de transcripción E2F, permitiendo la expresión de algunos genes que codifican proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y síntesis de ADN, incluyendo la ciclina E, la cual es requerida para la activación de la Cdk2. De esta manera el complejo ciclina E-



**Figura 2.** Fosforilación de la proteína Rb y progresión del ciclo celular. Rb o alguno de los miembros de la familia (p107 o p130), al ser fosforilados, liberan factores de transcripción (E2F y Dp) necesarios para la expresión de genes involucrados en las diferentes fases del ciclo celular.



**Figura 3.** Control de la función de *c-myc*. *C-myc* activada por Ras-ERK favorece la progresión del ciclo celular mediante la activación transcripcional de la ciclina D2 y CDK4, así como la modulación transcripcional de la ciclina D1, la activación del complejo ciclina E-CDK2 a través de Cdc25A, la represión transcripcional de p21, p27 y promoviendo la proteólisis de p27 a través de Cull.

Cdk2 participa en el mantenimiento de Rb en un estado hiperfosforilado y participa en el proceso de retroalimentación positivo para la acumulación de E2F activo, como algunos otros complejos de ciclina-Cdk, el complejo ciclina E-Cdk2 fosforila la histona H1 y esta actividad puede ser importante para el rearme de la cromatina, requerido durante la replicación del genoma<sup>47</sup> y la duplicación del centrosoma.<sup>48</sup> En este evento, también participa un sustrato del complejo ciclina E-Cdk2, una proteína nuclear llamada NPAT, la cual está presente en todas las etapas del ciclo celular y su fosforilación está implicada en la expresión de la histona, un proceso requerido para la entrada a la fase S.<sup>49,50</sup>

### *C-Myc*

El gene *c-myc* es transcrito en una forma estrictamente dependiente de la proliferación celular, por lo que es considerado un importante regulador de la proliferación. *C-myc* es parte de una pequeña familia de 4 miembros relacionados entre sí (*c-*, *N-*, *L-* y *s-myc*) y *B-myc*; aunque este último carece

de los dominios importantes para la función de las proteínas Myc. Las proteínas Myc, son factores de transcripción de la familia de zipper de leucina y dominio helice-asa-helice, que activa la transcripción formando heterodímeros con las proteínas Max. *C-myc* es un factor transcripcional, involucrado en la carcinogénesis a través de su papel en el control del crecimiento y la progresión del ciclo celular. Su sobre-expresión promueve la transición G1-S (Figura 3).<sup>51-53</sup>

### Punto de restricción

El término Punto de Restricción (R) fue acuñado en 1974 por Arthur Pardee, para definir un evento específico en G1 después del cual las células cultivadas pueden proliferar independientemente de un estímulo mitogénico. Las células cultivadas de mamífero que han sufrido mitosis tres horas previas, pueden ser detenidas de la progresión a través del ciclo celular por eliminación de factores de crecimiento o inhibición moderada de síntesis de proteínas. Estas células

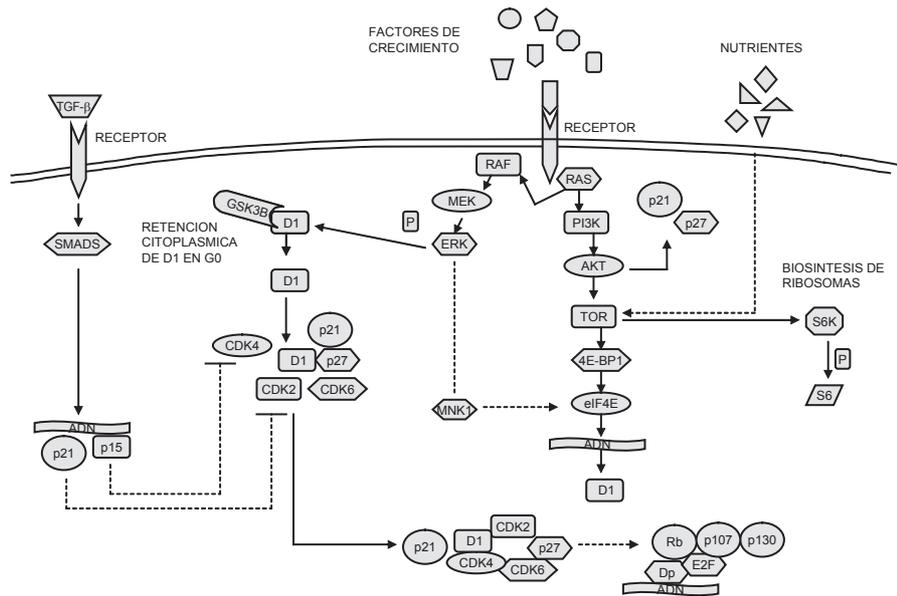


Figura 4. Factores inductores del bloqueo y el inicio de la proliferación celular.

entonces entran de nuevo al ciclo después de la re-estimulación con factores de crecimiento; sin embargo, si las células tuvieron una división celular 4 horas antes o más, ellas no responden a la falta del mitógeno y avanzan a través del ciclo con la misma cinética que las células que no son privadas. Ese fenómeno llevó a Pardee a postular que las últimas células habían pasado un punto de restricción (R) (Figura 1). R separa dos partes funcionalmente diferentes de G1 de células que están ciclando continuamente. Además no representa un punto de control o “checkpoint” como originalmente fue definido en levaduras. G1-pm representa el intervalo post-mitótico de G1 que perdura de la mitosis a R. G1-ps representa el intervalo prefase S de G1, que perdura de R a S. G1-pm es constante (duración aproximada de tres horas) en los diferentes tipos de células estudiadas. G1-ps, sin embargo, varía considerablemente, indicando que la entrada a S no es seguida directamente después del paso a través de R. Ahora es usado para dividir las fases temprana y tardía de G1. En células en cultivo R ocurre 3 o 4 horas después de la mitosis. Esta variabilidad es característica de la fase G1 tardía y explica algunas de las diferencias observadas a lo largo del ciclo celular.

La progresión a través de G1-pm requiere una continua estimulación por señales mitogénicas (factores de crecimiento) y una alta tasa de síntesis de proteínas. La interrupción de las señales mitogénicas o la inhibición moderada de síntesis de proteínas, conduce a una rápida salida del ciclo celular a G0 en células normales. Luego de la re-estimulación mitogénica, las células regresan al mismo punto en G1-pm después del cual éstas retornan al ciclo celular. Además la cinética diferencial de estas dos transiciones confirma diferentes mecanismos de control, en donde miembros de la familia de Rb, juegan un papel importante como frenos del ciclo que deben ser removidos.<sup>53,54</sup>

## Fases del ciclo celular

El intervalo de tiempo de una célula de mamífero para progresar a través del ciclo celular y sufrir una división varía dependiendo del tipo celular, como una consecuencia de las diferencias en el tiempo invertido entre la citocinesis y el punto de restricción, pero en promedio este dura aproximadamente 24 horas. El tiempo usado por una célula para pasar de la fase S a M es extremadamente constante entre las células; dura aproximadamente 6 horas para la fase S, 4 horas para la fase G2 y entre 1 y 2 horas para que se lleve a cabo la mitosis y la citocinesis; el resto es para transitar a lo largo de la fase G1 (Figura 1).<sup>55</sup>

### Transición GO/G1

El ciclo celular en mamíferos está altamente influenciado por señales externas durante la fase G0 y G1. La cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una de las vías más ubicuas de transducción de señales, la cual regula importantes procesos biológicos como la progresión del ciclo celular (Figura 4). La cascada MAPK está formada por tres proteínas cinasas evolutivamente conservadas: la cinasa cinasa de MAPK (MAPKKK), la cinasa de MAPK (MAPKK) y MAPK, que son activadas secuencialmente de una forma dependiente de Ras.<sup>56</sup> La cascada Ras-MAPK, favorece la expresión de las ciclinas del tipo D, inicialmente por MAPK la cual controla la activación del factor de transcripción denominada, la proteína activadora-1 (AP-1) y de los factores de transcripción ETS, que transactivan el promotor de la ciclina D, el cual contiene sitios de unión específicos para AP-1 y ETS.<sup>57</sup> La vía Ras-MAPK también regula post-transcripcionalmente las CDK, ya que puede intervenir en su ensamblaje y actividades catalíticas, en donde p21 y p27

además de su función inhibitoria, también participan en el ensamblaje de los complejos ciclina D-Cdk4 y ciclina D-Cdk6 durante la fase G1 temprana.<sup>58</sup>

Las ciclinas del tipo D como se mencionó antes, son las primeras ciclinas que son inducidas, permitiendo que las células salgan de G0 y puedan incorporarse al ciclo celular, y son importantes integradores del señalamiento mitogénico; la disponibilidad de la ciclina D1 es controlada por un balance entre las vías mitogénicas RAS/RAF/MAPK (para la síntesis de la ciclina D1) y RAS/PI3K/ATK (para darle estabilidad a la ciclina D1) así como por la actividad GSK-3beta y la actividad de SCF (favoreciendo la degradación de la ciclina). Asimismo, se ha observado que células en ausencia de la ciclina D1 pueden proliferar indicando que esta molécula no es estrictamente necesaria para G1, ya que como los tres tipos de ciclinas presentan una alta homología y son co-expresados en algunos tejidos, es posible que tengan funciones redundantes; sin embargo, la ciclina D1 facilita el paso a través de G1 y promueve la proliferación celular (Cuadro II). De igual manera, esta vía regula la síntesis de la familia de inhibidores CIP/KIP, ya que se ha demostrado que la estimulación con factores de crecimiento de células quiescentes causa la re-entrada del ciclo celular y la expresión transitoria de p21, la cual es dependiente de la actividad de MAPK.

### Fase G1

La fase G1 originalmente fue definida como un intervalo de tiempo (Fase Gap) entre los eventos claramente observados de síntesis de DNA y la mitosis, que aparece al término de las divisiones embrionarias, en donde sólo se presentan en forma alterna las fases M y S. Este es un intervalo de tiempo que requiere de algunas horas en diferentes células, durante el cual las células están sujetas a estimulación por mitógenos extracelulares, factores de crecimiento, o inhibidores de la proliferación, los cuales determinan cuando una célula quies-

cente puede iniciar con la proliferación, una célula en G1 puede seguir ciclando o regresar a un estado quiescente (Figura 2). La progresión a través de G1 es regulada por un mecanismo complejo que involucra tres Cdk's (Cdk2, Cdk4 y Cdk6) con sus respectivos reguladores (tales como ciclinas e inhibidores). Posterior a la señal mitogénica, se induce la síntesis de la ciclina D y posiblemente el transporte de Cdk4 y Cdk6 al núcleo. Los complejos activos Cdk4, Cdk6 unidos a las ciclinas tipo D, son esenciales para el paso a través de la fase G1, y ellos ejercen su regulación en la progresión del ciclo celular, a través de la fosforilación de diferentes sustratos entre los cuales la proteína Rb juega un papel preponderante.<sup>59</sup>

### Fase S

En la fase S se lleva a cabo la duplicación de los cromosomas y del centrosoma, es el momento en que la célula se prepara para la división celular. En este punto existe un punto de control o checkpoint, que asegura que el ADN no presente alteraciones antes de la replicación. Se caracteriza por la expresión de las enzimas necesarias para la biosíntesis de purinas y pirimidinas y de la maquinaria de replicación, en donde destacan el antígeno de proliferación nuclear "PCNA" y la polimerasa de ADN. Durante esta fase se expresa el antígeno Ki 67 cuya función se desconoce pero, sirve como un marcador histopatológico de células proliferantes. La ciclina A, también es regulada por E2F, y se acumula en la transición de la fase G1-S y persiste a través de toda la fase S. El inicio de la fase S correlaciona con la formación de los complejos ciclina A-Cdk2, pero al final de la fase S ésta se asocia con la Cdk1 (Figura 2). De esta manera, se puede observar que la ciclina A asociada a la actividad de cinasas, es necesaria para la entrada a la fase S, su culminación y entrada a la mitosis. Debido a que el genoma eucariótico es extremadamente largo ( $10^7$  a  $10^9$  pares de bases - pb-), la duplicación ocurre como un proceso simultáneo entre 10,000

**Cuadro II. Complejos formados por las Ciclinas-Cinasas Dependientes de Ciclinas (Cdks). Se muestra la interacción formada por las ciclinas-Cdks y los sitios de unión, así como sus respectivos sustratos en las diferentes fases del ciclo celular.**

CDK	Ciclina	Actividad en las fases del ciclo celular	Motivos de unión a ciclinas	Sustratos
1	A1,A2,B1,B2,B3, E	G2/M	PSTAIRE	Histona H1, p53, Rb, STAT 3
2	A1, A2, E1, E2D1, D2, B1, B3	G1-S	PSTAIRE	B-Myb, p21, p27, p53, p107, pRb, Smad3
3	E1,F2,A1,A2, C	Go-G1-S	PSTAIRE	CABLES 1
4	D1, D2, D3	G1-S	PISTVRE	p107, p130, pRb, Smad3
5	P35, P39 (D-E y TIPO G)	Senescencia	PSSALRE	Inhibidor de proteína fosfatasa 1, STAT 3
6	D1, D2, D3	G1-S	PLSTIRE	p107, p130, pRb
7	H	Cinasa activadora DE CDK	NRTALRE	CDK-CDK6, p53, RNA polimerasa II
8	C	Transcripción	SMSACRE	RNA polimerasa II
9	T1, T2	Transcripción	PITALRE	pRB, RNA polimerasa II
10	¿?	G2-M, Transcripción	PISSLRE	¿?
11	L1, L2 (D)	M, Transcripción	SMSACRE	Ciclina L

y 100,000 sitios de síntesis paralelas, también denominadas orígenes de replicación.<sup>60</sup> Asimismo, se ha podido demostrar que el inicio de la replicación del ADN se lleva a cabo en dos pasos: el primero está dedicado al ensamblaje de los factores de iniciación al origen de la replicación, y el segundo consiste en la inducción de los complejos para activar la síntesis del ADN mediante la acción de proteínas cinasas. El origen de replicación del ADN, también llamado secuencia de replicación autónoma (ARS) contiene regiones consenso altamente conservadas de 100 a 200 pb, conocidas como secuencias consenso (ACS), la cual es un componente esencial del origen de replicación, que se une al complejo del origen de reconocimiento (ORC); hasta el momento, se han identificado 3 subunidades ORC en el humano HsORC1, 2 y 4.<sup>61</sup>

Por otra parte, se ha demostrado que CDC6 es una proteína adaptadora clave para las interacciones del ORC, con diferentes proteínas como las del mantenimiento del minicromosoma (MCM) en la replicación del ADN. Esta molécula se fosforila en el núcleo durante la fase S, por el complejo ciclina A-CDK2 y posteriormente se transporta al citoplasma.<sup>62</sup> Las proteínas MCM están formadas por un complejo de 6 proteínas relacionadas que forman un componente esencial del complejo de iniciación del ADN, estas se asocian con la cromatina en la fase G1, y en la fase S son fosforiladas, por lo que se reduce su afinidad a la cromatina, lo que asegura que la replicación ocurra sólo una vez por ciclo. De igual forma, otras dos cinasas son importantes en el inicio de la replicación, tal es el caso de las CDKs y la cinasa Dbf4/CDC7, las cuales pueden asociarse con las proteínas MCM.<sup>63</sup>

### Transición G2/M

La fase G2 es la segunda fase gap en el ciclo celular en el cual la célula evalúa el estado del material genético replicado y se prepara para la fase M; en esta fase, el complejo ciclina B-CDC2 es el regulador mitótico clave de la transición G2/M. La síntesis de la ciclina B se inicia al final de la fase S, y hasta el momento se conocen 2 isoformas B1 y B2. B2 no es importante para el crecimiento y el desarrollo, ya que se asocia con el aparato de Golgi; mientras que B1 es responsable de algunas de las acciones de CDC2 en el citoplasma y el núcleo, y puede compensar la ausencia de B2. La CDC2 es fosforilada positivamente por la cinasa activadora de CDK (CAK) en la región conservada de Thr 160 y en la fase G2, el complejo ciclina B-CDC2, sin embargo se mantiene en un estado inactivo por la fosforilación de CDC2 en el residuo de Thr 14 que evita la unión de ATP y en el residuo de Thr 15, que interfiere con la transferencia del fosfato. El complejo nuevamente es activado después de la desfosforilación de estos sitios por la fosfatasa CDC25C.<sup>64</sup>

### Fase M

La mitosis, involucra las etapas de cariocinesis (división del contenido cromosómico celular) y citocinesis (división del contenido citoplásmico), mismas que constituyen la fase más corta del ciclo celular eucariótico, ya que dura entre 1 y 2 hrs

en células de mamífero. Esta comprende: profase, prometafase, metafase anafase y telofase.

Un evento relevante durante la mitosis es la ruptura de las láminas nucleares (A, B y C), las cuales están formadas por filamentos intermedios de lámina, localizados adyacentes a la cara interna de la envoltura nuclear. Durante la mitosis temprana, el Factor Promotor de la Maduración (FPM), constituido por la proteína cinasa de 34 Kda y CDK1 (p34<sup>cdc2</sup> / CDK1) unido a la ciclina B, (Complejo ciclina B-CDC2) fosforila residuos específicos de serina en las tres láminas nucleares, causando la despolimerización de estos filamentos intermedios. En esta etapa, se registra un incremento en los niveles de las ciclinas A y B de las cuales la primera puede formar complejos con Cdk1 o la proteína cinasa de 34 kDa (activa también en la mitosis en levaduras) para fosforilar sustratos ricos en residuos de serina y treonina. Además de la lámina nuclear, este complejo fosforila otros sustratos como la vimentina (constituyente de los filamentos intermedios que se extiende a través del citoplasma), y caldesmona (componente no estructural de los microfilamentos citoplásmicos). El complejo p34/ciclina B induce la hiperfosforilación de la lámina y promueve el desensamblaje de la lámina nuclear y su ruptura. La reorganización del citoesqueleto en la fase M se produce por la fosforilación de la vimentina y caldesmona.<sup>65</sup>

El complejo ciclina B-CDC2, está involucrado en el inicio de diferentes eventos mitóticos, tanto en el citoplasma así como en el núcleo. Durante la profase, B-CDC2 está asociado con centrosomas duplicados y esto promueve la separación del centrosoma por la fosforilación de la proteína Eg5 asociada al centrosoma. La ciclina B1-CDC2 y/o los complejos B2-CDC2 también están involucrados en la fragmentación del Golgi por tanto, el complejo y B-CDC2 están relacionados en reorganizar completamente la arquitectura celular durante la mitosis.<sup>66</sup>

De acuerdo con lo antes descrito, se puede observar que la progresión del ciclo celular es un proceso extremadamente complejo, en el que están involucradas un gran número de moléculas, las cuales cumplen con una función particular, en donde las diferentes señales externas pueden favorecer una progresión continua, división, paro del ciclo (ya sea por eventos de maduración y/o diferenciación), reparación de algún daño detectado en el ADN o la muerte; todo esto implícito en el tiempo de duración del ciclo celular, el cual es muy variable, y éste va a depender del tipo celular, de las condiciones del medio y el estado de maduración de las células.<sup>3</sup> Un buen modelo de estudio, en donde se pueden observar los diferentes cambios presentes durante los procesos de proliferación y maduración celular, es el relacionado con las células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

## Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado, mediante el cual se generan todas las células de la sangre. Este se lleva a cabo en diferentes órganos a lo largo del desarrollo prenatal, iniciando en el saco vitelino, y siguiendo en el

hígado fetal, bazo fetal y médula ósea (MO). Este último es el órgano en el que se desarrolla más del 95% de la actividad hematopoyética en la etapa postnatal.<sup>67</sup>

### Células progenitoras

De acuerdo con las características que presentan las células, el sistema hematopoyético se ha dividido en cuatro compartimentos (Figura 5).

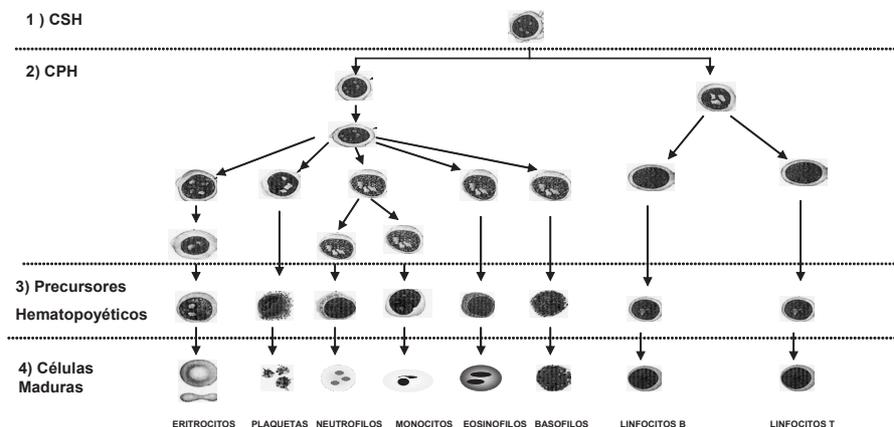
- 1) Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), consideradas las más primitivas, capaces de autorrenovarse, originar células de los distintos linajes sanguíneos y restablecer la hematopoyesis *in vivo*. Las células hematopoyéticas más primitivas no presentan marcadores de linaje (Lin-) y mantienen una morfología que no corresponde a ninguna línea de diferenciación definida. El principal marcador usado para su aislamiento ha sido la molécula CD34, la cual participa en mecanismos de adhesión celular. Las células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>, que incluyen a las células progenitoras representan aproximadamente, el 0.5% del total de las células de la médula ósea. A su vez a partir de células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> puede ser aislada otra subpoblación carente del antígeno CD38 conocida como CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>, que incluyen a células progenitoras, representa menos del 0.2% del total de las células de la médula ósea.<sup>68</sup>
- 2) Células progenitoras hematopoyéticas (CPH), una población extremadamente heterogénea, que representa entre el 0.1-0.5% del total de las células presentes en médula ósea. Las CPH son positivas al antígeno CD34 e incluyen células positivas y negativas a los diferentes linajes sanguíneos. Estudios *in vitro* han mostrado que estas células se caracterizan por su capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos.
- 3) Precusores reconocibles morfológicamente, que representan más del 95% de las células residentes de la médula ósea.

- 4) Células sanguíneas maduras, las cuales después de un proceso de proliferación, diferenciación, maduración, e incluso apoptosis, se encuentran presentes en la circulación.<sup>69</sup>

Durante muchos años, la MO fue la principal fuente de CTH y CPH; sin embargo, desde 1976, y en 1988, se demostró la presencia de CTH y CPH en la sangre periférica de pacientes tratados con quimioterapia y factores de crecimiento, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Al igual que lo observado por Broxmeyer en la sangre del cordón umbilical (SCU). Se ha demostrado que estas dos fuentes ricas en células troncales y progenitoras hematopoyéticas, tienen un potencial de proliferación que llega a ser superior al de la MO; como ha sido observado en la SCU, y actualmente se usan como un buen recurso en terapias clínicas para trasplantes en enfermedades hematológicas y no hematológicas.<sup>70</sup>

### El ciclo celular en células progenitoras hematopoyéticas

Las CTH tienen la capacidad de renovarse indefinidamente, mientras poseen el potencial para diferenciarse en múltiples linajes. No obstante, *in vivo*, su tasa de proliferación bajo condiciones fisiológicas es mucho más lenta que la de su progenie intermedia, en las que se incluye a las células progenitoras y precursoras proliferantes. La quiescencia observada en estas células, asegura que la población de las CTH no se pierda bajo condiciones de estrés fisiológico y pueda mantenerse a lo largo de toda la vida del individuo.<sup>71</sup> La proliferación altamente regulada ocurre a una tasa muy limitada, bajo las condiciones de procesos homeostáticos. De esta forma, se mantiene la hipótesis, de que la alta quiescencia de las células CTH, refleja el completo arresto del ciclo celular de la mayoría de las células en el compartimiento de las CTH, llamado "el modelo de sucesión clonal".<sup>72</sup>



**Figura 5. Proceso hematopoyético.** La hematopoyesis se ha dividido en cuatro compartimentos debido a las características que se presentan en cada una de las subpoblaciones. Ver texto.

Recientemente se postuló, que la posición específica en el ciclo celular determina cuándo una célula primitiva funciona como una célula CTH o CPH, lo cual sugiere que el estímulo recibido en distintas fases del ciclo celular, puede llegar a provocar proliferación y/o diferenciación.<sup>73</sup>

La quiescencia relativa de las CTH puede prevenir su prematura reducción numérica *in vivo*, pero ha sido considerada uno de los obstáculos en el contexto de la expansión *in vitro*, necesarios para el trasplante de CTH y la terapia génica. En los últimos años, diversos estudios se han enfocado en encontrar las condiciones de cultivo *in vitro* que permitan expandir y mantener la población de las CTH capaces de repoblar la médula ósea de individuos inmunosuprimidos. Los esfuerzos realizados se han centrado en el uso de diferentes citocinas recombinantes hematopoyéticas, para de esta forma lograr expandirlas, en donde se considera que los reguladores del ciclo celular pueden jugar papeles importantes en estos procesos.

En células de mamífero, la maquinaria del ciclo celular que determina cuando una célula puede continuar proliferando o puede detener su división y diferenciarse, opera ampliamente en la fase G1. Se ha demostrado que las dos familias de reguladores del ciclo celular (Cip/Kip e INK4), son esenciales en el arresto de la progresión del ciclo celular, en un amplio espectro de tipos celulares.<sup>74</sup> Para definir los mecanismos en la respuesta de las CTH se requiere del análisis de reguladores de forma individual y así poder describir cómo estos reguladores interactúan con otras moléculas e intersectan varias vías de señalización. Específicamente, en el sistema hematopoyético se ha detectado que algunos miembros de la familia de reguladores se expresan de forma diferencial en las células CD34+.<sup>71,75-78</sup>

Se ha encontrado que en las CTH humanas quiescentes el RNAm es muy reducido y en las CPH este se encuentra más abundante; de igual forma, se ha detectado que p21 gobierna la entrada del ciclo celular de las mismas CTH y que su ausencia incrementa la capacidad proliferativa.<sup>79,80</sup>

De esta manera, se puede determinar que el éxito de la capacidad proliferativa y de expansión, entre otros factores, está directamente relacionado con el estado de quiescencia en el que se encuentran estas células; ya que se ha demostrado que un alto porcentaje de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular. Asimismo, se ha observado, que las CPH, que se encuentran en la fase G0, tienen un mayor potencial de proliferación que aquellas que se encuentran en la fase G1.<sup>81</sup> Sin embargo, no todas las células tienen ese potencial de proliferación y esto también va a depender del destino celular, ya que de la población de CTH y CPH que presentan el antígeno CD34, no todas están destinadas a dividirse y como consecuencia a diferenciarse, o bien pueden dividirse y mantener las mismas características de una célula pluripotencial, o bien llegar a diferenciarse. Debido a esto, dichas poblaciones celulares derivadas del sistema hematopoyético, han sido aisladas y sujetas a estudios *in vivo* e *in vitro*, para medir su función hematopoyética y dependiendo del grado de aislamiento y purificación, se ha encontrado que las CTH no son una población homogénea, ya que se reagrupo-

pan en subpoblaciones que expresan diferentes antígenos de superficie, con potenciales de diferenciación y proliferación variable.<sup>82,83</sup>

De acuerdo con lo anterior, se sugiere que las diferentes subpoblaciones de células CD34+ presentan variaciones en el número de moléculas reguladoras del ciclo celular, las cuales estarían muy relacionadas con los eventos celulares que se han observado *in vitro*. Tal es el caso del proceso de diferenciación, que se asocia con una disminución de la proliferación celular y a la salida de las células del ciclo celular. En este proceso se ha encontrado una participación importante de p21 y p27;<sup>74,84,85</sup> ya que la diferenciación celular frecuentemente involucra picos secuenciales en la expresión de los CDKs, por ejemplo: un incremento en los niveles de expresión de p27, es seguida de un incremento en la regulación de p21 en importantes tipos celulares, inducidos a diferenciarse por diversos estímulos.

A continuación, se muestran algunas de las evidencias que se tienen en líneas celulares, CTH y CPH, haciendo énfasis particular en los CDKs, ya que debido a su importancia en la regulación del ciclo celular, son elementos clave en procesos de proliferación y diferenciación.

Entre otras, se ha observado que en la línea celular mielóide M07e y en progenitores mieloides de ratón, la presencia del Factor de Células Stem (SCF) y el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), actúan de forma sinérgica y esto induce la sobre-expresión de p21, y como consiguiente una disminución de p27; de esta manera p21 se asocia con la proteína CDK2, la cual incrementa su actividad y por lo tanto los niveles estequiométricos de las moléculas. Evento que tiene como consecuencia un incremento en la capacidad proliferativa de las células, importante para el mantenimiento del compartimiento de las CTH y CPH.<sup>86</sup>

De igual manera, en diversas líneas celulares leucémicas, tales como la HL-60, en donde se observaron diferencias en la expresión de p21 y un arresto del ciclo celular, éste de acuerdo con las condiciones de cultivo utilizadas, las cuales pueden ser o no independientes de la presencia de p53;<sup>87</sup> ya que en el caso de la línea K562, se ha demostrado que el gene WAF1/CIP1 que codifica a p21, puede participar activamente en una disminución de la proliferación y un incremento en la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago. Lo cual sugiere que el gene WAF1/CIP1 puede ser regulado a través de múltiples mecanismos.<sup>88</sup> Años más tarde, se demostró en la misma línea celular, usando un vector de expresión de p21, que p21 induce la expresión de p27 y una disminución de su degradación por ubiquitina, todo esto demuestra que durante la diferenciación, se facilita una ordenada transición entre las dos moléculas, cada una de las cuales puede influenciar de distinta forma el proceso de diferenciación.<sup>89</sup> Mientras que en la línea U937, se demostró que la inducción de la expresión de p21, esta acoplada a la expresión de marcadores de diferenciación temprana. No obstante, en tales eventos, no se descarta la posibilidad de la participación de p27 en este proceso de diferenciación.<sup>90</sup> Tal es el caso de la línea celular de leucemia megacarioblástica CMK y UT27, en donde la sobre-expresión de p27, asociada con un incremento en la

expresión de p21, se induce la diferenciación de megacariocitos, además de que bajo estas condiciones no se detecta una participación de p16, p15 o p18.<sup>91,92</sup> Al igual que lo observado en la línea MEG-01s, en donde se observa la formación de complejos triméricos p21/p27/ciclina E.<sup>93</sup> Mientras que, en la línea celular macrofágica de ratón BAC1.2F5A, se ha demostrado que la presencia de Interferón-gama (INF- $\gamma$ ) promueve una disminución de la expresión de la actividad cinasa de CDK2, no se observan cambios en p21 durante la progresión del ciclo celular, y los niveles de p27 son máximos en la fase G1 temprana, para posteriormente disminuir de forma gradual conforme avanza el ciclo celular, lo que evita la formación activa de los complejos CDK2/p27, evitando la progresión a través de la fase S y por lo tanto, la diferenciación.<sup>94</sup> En el caso de la línea celular eritroleucémica HB60-5, que prolifera y se diferencia en presencia de SCF y Eritropoyetina (Epo), después de 48 hrs de cultivo, se ha observado que con la sola presencia de Epo, se inhiben las actividades de CDK4 y CDK6, este evento se asocia con un incremento en la unión de p27 y p15 a CDK6; y un incremento de p27 unido a la ciclina A y E, lo cual correlaciona con la inhibición de CDK2; no obstante, no se detecta una participación de p27 en el proceso de diferenciación hacia el linaje eritroide, lo que indica que los niveles de expresión de p27, son necesarios para la diferenciación inducida por SCF.<sup>95</sup>

En la línea de células progenitoras mieloides de ratón 32Dcl3, la presencia de interleucina 3 (IL-3) mantiene en un estado indiferenciado a estas células, debido a un incremento en la expresión de p21 y del receptor para IL3 (RIL-3), lo cual produce un defecto en la maduración de linaje mieloides, ya que las células se mantienen como mieloblastos. Estas evidencias han sido correlacionadas con la patogenia de la Leucemia Mieloides Aguda (LMA).<sup>96</sup>

Se ha mostrado en diversas líneas celulares inducidas al proceso de diferenciación una sobrerregulación de p21. Sin embargo, los mecanismos de la inducción de p21 durante la diferenciación normal no es muy clara. En células precursoras de SCU, se ha demostrado un incremento en el nivel de expresión de p21, relacionado con la maduración mieloides,<sup>97</sup> y en colonias derivadas de células CD34+ de SCU, médula ósea y SPM se ha observado un incremento en el ARNm de p21 a través del tiempo, en granulocitos, macrófagos, megacariocitos y eritroblastos, mientras que por su parte el nivel de p27 se mantiene bajo, excepto en las colonias explosivas eritroides. La proteína p27 es constante en megacariocitos y monocitos de SPM y MO y células plasmáticas.<sup>75,98</sup>

Asimismo, se ha determinado *in vitro*, la participación de p21 y p27 en la diferenciación normal de blastos de células CD34+, y se ha encontrado que p27 es expresada en células CD34+ frescas, mientras que el nivel de p21 correlaciona con la tasa proliferativa; sin embargo, dicha expresión disminuye cuando las células alcanzan un proceso de diferenciación terminal; por su parte, p27 se mantiene constante durante todo el proceso, con diferentes sitios de localización subcelular.<sup>77</sup>

Por otro lado, recientemente se demostró en una rara subpoblación de células CD34+Lin de SCU, una marcada resistencia a ciclar en presencia de factores de crecimiento y

citocinas durante varios meses, y se determinó que p27 se expresa de una forma constante durante todo el tiempo de cultivo, mientras que la expresión de p21 es muy variable, no obstante, mantiene a las células en una prolongada quiescencia, siendo indispensable y p27 necesaria para el arresto del crecimiento.<sup>99</sup> Siguiendo con este punto, se demostró que p27 participa en la regulación de la autorrenovación y la diferenciación de las CTH de médula ósea.<sup>100</sup>

En lo que respecta a p16, se ha detectado una alta expresión en las CTH de MON; sin embargo, su presencia disminuye en progenitores comprometidos y en relación con la entrada a la fase de síntesis del ciclo celular, similar a lo que ocurre en las CPH de SPM<sup>78,101</sup> mientras que la expresión de p21, la ciclina D y CDK4 aumentan conforme aumenta el grado de diferenciación. De igual manera se ha observado que en cultivos prolongados, se pierde la capacidad de las CTH y se ha demostrado una baja participación de p16 y p19, lo que indica que mecanismos independientes de estas moléculas, juegan papeles dominantes en las CTH durante el cultivo.<sup>102</sup>

Por otra parte, se determinó, que la ausencia de p18 en CTH de un modelo de trasplante de ratón, se induce un incremento en las divisiones de autorrenovación y se incrementa el injerto a largo plazo, sugiriendo que p18 es un fuerte inhibidor limitante del potencial de autorrenovación de las CTH *in vivo*;<sup>103</sup> y en células humanas se observó que la ausencia de p18, disminuye la pérdida de las células que son negativas para p21.<sup>104</sup>

La presencia de algunos inhibidores de la hematopoyesis tales como el TGF- $\beta$ , reducen la expresión de receptores de citocinas en la membrana celular, tales como el receptor de la Interleucina-6 (RIL-6), receptor de c-Kit, del Receptor del ligado de FLT3 y el receptor de Eritropoyetina (REpo), y promueve el incremento en la proteína p21, y de forma conjunta inducen el arresto del ciclo celular, al tiempo que disminuye la capacidad proliferativa y se mantiene a las CTH y CPH humanas en las fases G0-G1.<sup>79,105</sup>

En células precursoras hematopoyéticas CD34+ humanas, ha observado que la sola presencia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 en el cultivo, induce sobre-expresión de p27, sin alguna modificación significativa en el estado del ciclo celular y su capacidad de proliferación a corto plazo. Lo que demostró la participación del TGF- $\beta$  en los mecanismos autocrinos de la regulación de la población de CTH así como, el papel de p27 (en altos niveles de expresión) en la inducción prematura a la diferenciación de progenitores, y la posible contribución a la pérdida del potencial de los precursores hematopoyéticos.<sup>106</sup>

Durante el cultivo de células CD34+ normales, se induce la diferenciación de granulocitos y megacariocitos, pero no de linaje eritroide, se ha detectado la presencia de p15, este nivel de expresión se incrementa conforme avanza el grado de maduración de las células.<sup>107</sup>

## Conclusiones

El ciclo celular es un proceso importante en todos los tipos celulares, ya que de este dependen muchas de las funciones

vitales de los diferentes tejidos que se encuentran en los organismos. En el ciclo celular están implícitas un gran número de moléculas, y de acuerdo con niveles estequiométricos, su presencia puede jugar papeles importantes en los procesos de proliferación, diferenciación, maduración e incluso apoptosis. No obstante, la pérdida del balance entre los niveles de expresión, fosforilación translocación al núcleo y degradación, pueden provocar alteraciones en la tasa proliferativa de las células en los diferentes tejidos donde esto ocurra.

Es interesante saber que a pesar de las diferentes funciones encontradas de algunas de las moléculas involucradas en este proceso. No todas actúan de igual forma, ya que como se ha observado en el sistema hematopoyético, las moléculas como p21 o p27 pueden tener funciones diferentes a las que en un inicio fueron caracterizadas. Esto implica procesos de proliferación, diferenciación o maduración. Tales comportamientos van a depender del tipo celular, las características de las células en donde se realizan dichos análisis, como el estado de diferenciación y madurez de las células, o bien de acuerdo con las condiciones del medio.

Sin embargo, el conocer algunos de los aspectos relacionados al ciclo celular en las CTH y CPH, ayuda a entender un poco más acerca de la biología de estas células a lo largo de todo el proceso hematopoyético, y nos proporciona herramientas para su manipulación que puedan ayudarnos a aplicar alternativas terapéuticas en procesos expansión, y proliferación para fines de trasplante y regeneración hematopoyética.

## Referencias

- Murray A, y Hunt T. The cell cycle. An Introduction. Oxford University Press. 1993.
- Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1999;39:295-312.
- Israels ED, Israels LG. The Cell cycle. Stem Cells 2001;19:88-91.
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nature Reviews 2001;1:222-231.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997;24:4876-4882.
- Russell P. y Nurse P. Shizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided. Cell 1986; 45:781-782.
- Malumbres M, Barbacid M. Mammalia cyclin-dependent kinases. Trends Biochem. Sci 2005;30:630-41.
- Conget PA, Mingell JJ. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. Exp Hematol 2000;28:382-90.
- Aleemet E, Kiyokawa H, Kaldis P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. Nat. Cell Biol 2005;7:831-836.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. Cell 2004;118:493-504.
- Ren S, Rollins BJ. Cyclin/Cdk3 promotes Rb-dependent Go exit. Cell 2004;117:239-251.
- Lilja L, Johansson JU, Gromada J, Mandic SA, Fried G, Berggeren PO, et al. Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+) dependent exocytosis. J. Biol Chem 2004;279:29534-29541.
- Zhang L, Gjoerup O, Roberts TM. Serine/threonine kinase cyclin G-associated kinase regulates epidermal growth factor receptor signaling. Proc. Natl. Acad. Sci 2004;101:10296-10301.
- Lolli G, Johnson LN. CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and target for drugs? Cell Cycle 2005;4:572-577.
- Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. Nature 2000;407:102-106.
- Garriga J, Graña X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. Gene 2004;337:15-23.
- Kasten M, Giordano A. Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. Oncogene 2001;20:1832-1838.
- Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. Cell. Signal. 2005;17:1033-1051.
- Roberts M.J. Evolving ideas about cyclins. Cell 1999;98:129-132.
- Evans T, Rosenthal ET, Younglom J, Distel D, 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.
- Hunt T. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. Curr. Opin. Cell Biol 1989;1:268-274.
- Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature 1990;344:503-508.
- Xiong Y, Beach D. Population explosion in the cyclin family. Curr. Biol 1991;1:362-364.
- Peter M. The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Prog Cell Cycle Res 1997;3:99-108.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 1993;366:704-707.
- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. Nature 1994;371:257-261.
- Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, et al. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. Genes Dev 1994;8:2939-2952.
- Chan FK, Zhang L, Chen L, Shapiro DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. Mol. Cell. Biol 1995;15:2682-2688.
- Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E. Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. Mol. Cell. Biol 1999;19:1775-1783.
- Thullberg M, Bartkova J, Khan S, Hansen K, Ronnstrand L, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. FEBS Lett 2000;470:161-166.
- Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP. Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. Genes Dev 2000;14:3115-3125.
- Ly Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res 1994;54:6078-6082.
- Gu Y, Turk CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. Nature 1993;366:634-635.
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. Exp. Cell Res 1994;211:90-98.
- Poliak K, Kato J, Solomon MJ, Ser CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev 1994;8:9-22.
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parquer S, Zhang P, Baldini A, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. Genes Dev 1995;9:650-662.
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. Nature 1995;374:386-388.
- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. Nature 1996;382:325-331.
- Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. Oncogene 2005;24:2787-2795.
- Feng XH, Lin X, Derinck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15 (Ink4B) transcription in response to TGF-beta. EMBO J 2000;19:5178-5193.
- Nevis JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. Cell Growth Differ 1998;9:585-593.
- Cam H, Dynlacht BD. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. Cancer Cell 2003;3:311-316.
- Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev 1998;12:2245-2262.
- Aslanian A, Iaquinta PJ, Verona R, Lees JA. Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. Genes Dev 2004;1413-1422.
- Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2002;3:11-20.
- Kherrouche Z, De Launoit Y, Monte D. Human E2F6 is alternatively spliced to generate multiple protein isoforms. Biochem. Biophys. Res. Commun 2004;317:749-760.
- Tsai KY, HY, Macleof KF, Crowley DY, Yamasaki L, Jacks T. Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry at extends survival of Rb-deficient mouse embryos. Moll Cell 1998;2:293-304.
- Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2817-2822.
- Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, Fletcher JA, Harlow E. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene. Genes Dev 2000;14:2283-2297.

50. **Zhao J, Dynlacht B, Imai T, Hori T, Harlow W.** Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev* 1998;12:456-461.
51. **Bouchar C, Staller P, Eilers M.** Control of cell proliferation by Myc. *Trends in Cell Biology* 1998;8:202-206.
52. **Nasi S, Ciarpica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L.** Making decisions through Myc. *FEBS Letters* 2001;490:153-162.
53. **Blagosklonny MV, Pardee AB.** The restriction point of cell cycle. *Cell Cycle* 2002;2:103-110.
54. **Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG.** What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:835-842.
55. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York U.S.A., 1994.
56. **Marshall MS.** Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 1995;9:1311-1318.
57. **Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J.** Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271:20608-20616.
58. **Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF.** Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1091-1096.
59. **Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K.** Cell proliferation and cell control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;12:1134-1141.
60. **Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weissshark K.** Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002;72:41-91.
61. **Iizuka M, Stillma B.** Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 1999;274:23027-23034.
62. **Findeisen M, E1-Denary M, Kapitzka T, Graf R, Strausfeld U.** Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6 and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* 1999;264:415-426.
63. **Ishimi Y.** A DNA helicase activity is associated with a MCM4, -6 and 7 protein complex. *J Biol Chem* 1997;272:24508-24513.
64. **Sanchez I, Dylcht BC.** New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:311-321.
65. **Ferby I, Blazquez M, Palmer A, Eritja R, Nebreda AR.** A novel p34 (cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus oocytes*. *Genes Dev* 1999;13:2177-2189.
66. **Ookata K, Hisanaga S, Okumura E, Kishimoto T.** Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in star fish oocytes. *J Cell Sci* 1993;105:873-881.
67. **Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A.** Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;34:49:225-233.
68. **Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE.** A Newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038-1045.
69. **Morrison SJ, Wright DE, Cheshier SH, Weissman IL.** Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr Opin Immunol* 1997;216-221.
70. **Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P.** Biology of human hematopoietic stem and hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 2003;476-488.
71. **Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT.** Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27<sup>kip1</sup>. *Nature Med* 2000;6:1235-1240.
72. **Rosedaal M, Adam J.** Haemopoiesis by clonal succession? *Blood Cells* 1984;10:473-485.
73. **Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF.** The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002;100:4266-4271.
74. **Serr CJ, Roberts JM.** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-1163.
75. **Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchamaru K, Asano S, Fujita T, et al.** Expression of p21 (Cip1/Waf1/Sdi1) and p27 (kip) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 1999;93:4167-4178.
76. **Tschan MP, Peters UR, Cajot JF, Betticher DC, Fey MF, Tobler A.** The cyclin-dependent kinase inhibitors p18INK4c and p19INK4d are highly expressed in CD34+ progenitor and acute myeloid leukaemic cells but not in normal differentiated myeloid cells. *Br J Haematol* 1999;106:644-651.
77. **Yaroslavskiy B, Watkins S, Doneberg AD, Patta TJ, Steinman RA.** Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 1999;93:2907-2917.
78. **Marone M, Pierelli L, Mozzetti S, Mascuillo V, Boanno G, Morosetti R, Rutella S, Battaglia A, Rumi C, Mancuso S, Leone G, Giordano A, Scambia G.** High cyclin-dependent kinase inhibitors in Bcl-2 and Bcl-xL-expressing CD34+ proliferating haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 2000;110:654-662.
79. **Ducos K, Panterre B, Fortunel A, Hatzfeld A, Monier MN, Hatzfeld J.** p21 (cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic cells. *J Cell Physiol* 2000;184:80-85.
80. **Stier S, Cheng T, Forkert R, Lutz C, Dombkowski DM, Zhang JL, Scadden DT.** Ex vivo targeting of p21 Cip/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;1260-1266.
81. **Summers YJ, Heyworth CM, Wynter EA, Chang J, Testa NG.** Cord blood Go CD34+ cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors in vitro than G1 CD34+ cells. *Stem Cells* 2001;19:505-513.
82. **Mayani H, Lansdorp PM.** Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153-165.
83. **Lewis ID, Verfaillie CM.** Multi-lineage expansion potential of hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 2000;28:1087-1095.
84. **Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradkey A, et al.** p53 independent expression of p21 Cip 1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995;1024-1027.
85. **Durand B, Gao FB, Raff M.** Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* 1997;16:306-317.
86. **Mantel C, Luo Z, Cafield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE.** Involvement of p21 cip-1 and p27 kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21 cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 1996;88:3710-3719.
87. **Zeng YX, e-Deiry WS.** Regulation of p21 WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 1996;12:1557-1564.
88. **Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Travali S, et al.** p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Research* 1995;55:668-674.
89. **Steinman RA, Lu Y, Yaroslavskiy B, Stehle C.** Cell cycle-independent up-regulation of p27Kip1 by p21Waf1 in K562 cells. *Oncogene* 2001;20:6524-6530.
90. **Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME.** Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994;11:3389-3396.
91. **Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, et al.** Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakarioblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21 (WAF/CIP1) by Stat5. *Mol Cell Biol* 1997;17:2933-2943.
92. **Kikuchi I, Furukawa Y, Iwase S, Terui Y, Nakamura M, Kitagawa S, et al.** Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood* 1997;89:3980-3990.
93. **Uchamaru K, Taniguchi T, Yoshikawa M, Fujinuma H, Fujita T, Motokura T.** Growth arrest associated with 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hematopoietic differentiation with a defective retinoblastoma tumor suppressor-mediated pathway. *Leukemia Research* 1998;22:413-420.
94. **Matsuoka M, Nishimoto I, Asano S.** Interferon- $\beta$  impairs physiologic downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27<sup>kip1</sup>, during G1 phase progression in macrophages. *Exp Hematol* 1999;27:203-209.
95. **Tamir A, Petrocelli T, Stetler K, Chu W, Howard J, Croix BS, et al.** Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differentiation* 2000;11:269-277.
96. **Ghanem L, Steinman RA.** p21Waf1 inhibits granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells. *Leuk Res* 2006; (Epub ahead of print).
97. **Steinman RA, Huang J, Yaroslavskiy B, Goff JP, Ball ED, Nguyen A.** Regulation of p21 (WAF1) expression during normal myeloid differentiation. *Blood* 1998;91:4531-4542.
98. **Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagraoui H, Sabri S, Le Couedic JP, et al.** Role of p21 (Cip1/Waf1) in cell cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood* 2001;98:3274-3282.
99. **Steinman RA, Yaroslavskiy B, Goff JP, Alber SM, Watkins S.** Cdk-inhibitors and exit from quiescence in primitive haematopoietic cell subsets. *Br J Haematol* 2004;3:358-365.
100. **Walkley CR, Fero ML, Chien WM, Purton LE, McArthur GA.** Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic. *Nat Cell Biol* 2005;2:172-178.
101. **Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwase S, Yamada H, Matsuda M.** Lineage specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br J Haematol* 2000;110:663-673.
102. **Stepanova L, Sorrentino BP.** A limited role for p16<sup>INK4a</sup> and p19<sup>Arf</sup> in the loss of hematopoietic stem cells. *Blood* 2005;106:827-832.
103. **Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T.** Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18INK4C and p21/Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* 2006;3:1200-1206.
104. **Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T.** *In vivo* self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* 2004;5:436-442.
105. **Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, Hatzfeld A.** Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res* 2003;13:445-453.
106. **Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Morosetti R, et al.** Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF- $\beta$ 1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood* 2000;95:3001-3010.
107. **Teofil L, Morosetti R, Martini M, Urbano R, Putzulu R, Rutella S, et al.** Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p15 (INK4B) during normal and leukemic myeloid differentiation. *Exp Hematol* 2000;28:519-526.

