

Papel de p38 MAPK en los efectos de la inhibición de la biosíntesis de colesterol en la progresión del ciclo celular en la línea promielocítica humana HL-60

Beatriz Ledo^a, Covadonga Martín^b, Carolina C. Sánchez^b, Gema de la Peña^a, Sara Blanco^a, Linder J. Figueroa^a, Diego Gómez-Coronado^{a,b} y Miguel A. Lasunción^{a,b,c}

^aServicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

^bCIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). España.

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid. España.

Introducción. El colesterol es necesario para la proliferación y la correcta progresión del ciclo celular. La inhibición sostenida de la biosíntesis de colesterol inhibe la citocinesis y da lugar a la aparición de células poliploides, efectos que pueden implicar la participación de las vías de estrés.

Objetivo. Estudiar el efecto de la inhibición terminal de la biosíntesis de colesterol sobre la vía de p38 MAPK y su papel en la progresión del ciclo celular.

Metodología. La inhibición de la biosíntesis de colesterol en las células promielocíticas humanas HL-60 se llevó a cabo con SKF 104976. En determinados casos, junto a este inhibidor, se inhibieron las vías de p38 MAPK y ERK1/2 empleando SB 203580 y PD 98059, respectivamente. El ciclo celular se estudió por marcaje con yoduro de propidio e incorporación de

bromodesoxiuridina y análisis por citometría de flujo, y la expresión de proteínas se analizó por *Western blot*.

Resultados. La inhibición de la biosíntesis de colesterol produjo la acumulación de células en G2/M y una activación transitoria de p38 MAPK, efectos que fueron revertidos por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), demostrando que se debían a la deficiencia de colesterol. En aquellas condiciones, la adición de SB 203580 aceleró la replicación del ADN acompañada de un aumento de la poliploidía. Contrariamente, la adición de PD 98059 inhibió la síntesis de ADN. Ni la inhibición de p38 MAPK ni la de ERK impidieron la división de las células previamente tratadas con SKF 104976 tras suplementarlas con LDL, ni de las células previamente sincronizadas en prometrafase con nocodazol.

Conclusiones. La inhibición de la biosíntesis de colesterol activa la vía de p38 MAPK a fin de impedir la poliploidía pero no tiene efecto sobre la culminación de la mitosis.

Palabras clave:

Colesterol. p38 MAPK. Ciclo celular. HL-60. Poliploidía.

Este trabajo ha sido realizado gracias, en parte, a una Beca FEA/SEA 2005 de Investigación Básica y al proyecto SAF2005-07308 del Ministerio de Educación y Ciencia. CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición es una iniciativa del ICSIII. LJF ha recibido una beca de la Fundación Carolina.

Correspondencia: Dr. M.A. Lasunción.
Servicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. de Colmenar, km 9,100.
28034 Madrid. España.
Correo electrónico: miguel.a.lasuncion@hrc.es

Recibido el 19 de mayo de 2008 y aceptado el 17 julio de 2008.

ROLE OF p38 MAPK IN THE EFFECTS OF CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS INHIBITION ON CELL CYCLE PROGRESSION IN HL-60 CELLS

Introduction. Cells require cholesterol for proliferation and correct progression of the cell

cycle. In the absence of cholesterol, the cells fail to undergo cytokinesis and polynucleated cells are generated. These effects could be mediated by stress signal transduction pathways.

Objective. To study the effects of cholesterol biosynthesis inhibition on the activity of p38 MAPK and to evaluate the role of this pathway on cell cycle progression.

Methodology. Human leukemia cells (HL-60) were incubated in the presence of SKF 104976, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. In some cases inhibitors of p38 MAPK and ERK1/2, namely SB 203580 and PD 98059, were added to the medium. Cell cycle progression was studied by flow citometry, both DNA content and bromodeoxyuridine incorporation into DNA, and protein expression of p38 MAPK was analyzed by western blot.

Results. Inhibition of cholesterol biosynthesis led to accumulation of cells in G2/M and a transient activation of p38 MAPK. These effects were reversed by supplementing the medium with LDL. The addition of SB 203580 accelerated DNA replication, which was accompanied by an increase of polyploidy. By contrast, the addition of PD 98059 inhibited DNA synthesis. Lastly, neither the inhibition of p38 MAPK nor ERK affected the division of cells treated with the cholesterol biosynthesis inhibitor following LDL provision, or mitosis completion from metaphase of cells previously synchronized with nocodazole.

Conclusions. Cholesterol deficiency induces p38 MAPK pathway activation in order to prevent polyploidy, but has no effect on mitosis completion.

Key words:
Cholesterol. p38 MAPK. Cell cycle. HL-60. Poliploidy.

Introducción

El colesterol es necesario para la proliferación celular. En este sentido, el colesterol no sólo es un componente integral de la membrana celular sino que también parece ejercer acciones reguladoras que permiten la correcta progresión del ciclo celular. En la línea promielocítica HL-60, hemos demostrado que la deficiencia de colesterol producida por inhibición de la biosíntesis de colesterol en células incubadas en un medio libre de colesterol, produce una serie de efectos que, en último término, impiden la división celular. Inicialmente se observa una retención de las células en G2/M, con inhibición de la citocinesis, que finalmente conduce

a la formación de células poliploides por un mecanismo de rereplicación¹. Todos estos efectos se evitan y revierten, al menos parcialmente, añadiendo colesterol al medio de cultivo, lo que demuestra que las acciones que ejerce el colesterol en esas etapas del ciclo celular son específicas²⁻⁴.

La progresión del ciclo celular se produce de una forma ordenada, lo que está mediado por la activación puntual de distintos complejos ciclina/Cdk y su desactivación posterior. Concretamente, la transición de G2 a mitosis está controlada por el complejo ciclina B1/Cdk1, cuya actividad está gobernada por expresión de la ciclina B1, su localización subcelular y la fosforilación de la Cdk1. Pues bien, hemos demostrado que la parada en G2/M producida por la deficiencia experimental de colesterol coincide con la disminución de la actividad de ciclina B1/Cdk1 y que la reposición de colesterol estimula la transcripción del gen de la ciclina B1 y, consiguientemente, la actividad del complejo^{3,4}.

Las células que superan ese punto de control de G2, transcurren por mitosis hasta completar la citocinesis, pero ven impedida la citocinesis¹. El requerimiento de colesterol para que se produzca la abscisión celular ha sido confirmado por otros investigadores⁵. Estos autores observaron que en los momentos previos a la citocinesis, el colesterol de la membrana es reclutado hacia el anillo mitótico y que la extracción selectiva de colesterol mediante metil-beta-ciclodextrina impide la citocinesis⁵.

Este papel del colesterol en la mitosis coincide con la estimulación de la biosíntesis de este lípido precisamente en esta etapa, como recientemente demostraron Bengoechea-Alonso et al⁶. Es interesante que la ciclina B1/Cdk1 es capaz de fosforilar SREBP en una zona próxima al dominio "phosphodegron", evitando su degradación por el proteasoma⁷, lo que explicaría la estimulación de la transcripción de los genes relacionados con la biosíntesis de colesterol y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) precisamente en mitosis.

La deficiencia de colesterol se puede considerar como un estrés ante el cual la célula puede responder activando algunas de las denominadas vías de estrés, entre las que se encuentra la de p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*). Esta vía se activa en respuesta a citocinas proinflamatorias y distintos tipos de estrés, como la radiación UV y los choques térmico y osmótico⁸⁻¹³. Por lo general, dichos estímulos son recogidos por las cinasas MKK3/6 que fosforilan a p38 en sendos residuos Thr y Tyr activándola. La activación de esta vía

conduce a la inhibición de la proliferación celular, como se ha demostrado repetidamente. Por ejemplo, la activación de p38 en G1 inhibe la expresión de la ciclina D1, lo cual impide la transición a S^{14,15}. En la transición de G2 a M, la activación de p38 MAPK por daño en el ADN conduce a la degradación de Cdc25C, lo cual impide la transición a M por falta de activación del complejo ciclina B1/Cdk1¹⁶. Por lo tanto, p38 MAPK actúa como una proteína reguladora que impide la proliferación celular en respuesta al daño celular¹² y, de hecho, la inhibición de la vía de p38 MAPK resulta en la estimulación de distintos genes relacionados con la proliferación celular y en un aumento del índice mitótico en diferentes líneas celulares^{11,17,18}. p38 MAPK se considera actualmente como un importante gen supresor de tumores, como p53^{10,12}. Recientemente se ha demostrado que p38 MAPK participa activamente en la regulación fisiológica de la transición a mitosis en ausencia de estrés¹⁹.

Otros autores han establecido una conexión entre el metabolismo de lípidos y la vía de p38 MAPK, en el sentido de que la activación de esta vía produce una inhibición de la expresión del receptor de LDL²⁰ mientras que la inhibición de p38 MAPK induce la expresión de dicho receptor⁹.

En el presente trabajo se ha estudiado el papel de p38 MAPK en los efectos producidos por la inhibición terminal de la biosíntesis de colesterol en la progresión del ciclo celular. Se ha observado que la inhibición de la biosíntesis de colesterol produce la activación de p38 MAPK y que, en esas condiciones, la inhibición de ésta conduce a la poliploidía. Estos resultados sugieren que en respuesta a la deficiencia de colesterol, la célula responde activando p38 MAPK, tratando de frenar la replicación del ADN.

Métodos

Cultivos celulares

Las células de la línea promielocítica humana HL-60 (ATCC CCL 240) se mantuvieron en un medio libre de colesterol DCCM-1 (Biological Industries), que contenía penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml y gentamicina 100 µg/ml (Gibco, BRL). Para la inhibición de la biosíntesis de colesterol, las células se incubaron en presencia de SKF 104976 1,5 µM (SmithKline Beecham), un inhibidor de la lanosterol 14α-desmetilasa^{3,21}, disuelto en DMSO (concentración final en el medio, 0,04%). En determinados casos, el medio se supplementó con colesterol libre disuelto en etanol (concentración final en el medio, 0,4%) o bien LDL humanas aisladas por ultracentrifugación. Para la inhibición de las vías de p38 MAPK y de ERK, las células se incubaron en presencia de los inhibidores específicos SB 203580 20 µM y PD 98059 50 µM, respectivamente. Para sincronizar las células en prometafase, se añadió al medio nocodazol 0,05 µg/ml, un inhibidor de la formación de los microtúbulos.

Análisis del ciclo celular

Las células se cultivaron a una densidad de 3×10^5 células/ml y tras los diferentes tratamientos experimentales se recogieron por centrifugación y se fijaron en etanol al 70% durante 30 min a -20 °C. Después del proceso de fijación se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h a 37 °C en una solución de ribonucleasa A 100 µg/ml y yoduro de propidio 50 µg/ml. Posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson), excluyéndose los dobletes utilizando la representación de área (FL2-A) frente a la anchura (FL2-W).

Análisis de la fase S activa del ciclo celular por incorporación de bromodesoxiuridina

Tras los diferentes tratamientos experimentales se recogieron $2-4 \times 10^6$ células y se incubaron durante 1 h en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU) 100 µM (Sigma Aldrich) a 37 °C. A continuación las células se lavaron con PBS y se fijaron en etanol al 70% durante 30 min a -20 °C. Una vez fijadas se incubaron durante 20 min en HCl 2 N a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se lavaron 3 veces con PBS. Después las células se resuspendieron en 1 ml de tampón tetraborato de disodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M pH 8,4), se centrifugaron, se lavaron una vez más con PBS y se resuspendieron en una solución de bloqueo compuesta por 500 µl de PBS, 0,5% Tween 20 (Sigma Aldrich), 1% NGS (Normal Goat Serum, Vector) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalizado el proceso de bloqueo las células se centrifugaron y resuspendieron en la misma solución, a la que se añadieron 20 µl de anticuerpo anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson), incubándolas durante 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron 2 veces con PBS, 0,5% Tween 20 (Sigma Aldrich) y se tiñeron con yoduro de propidio 50 µg/ml en una solución que contenía 100 µg/ml de ribonucleasa A durante 1 h a 37 °C. Finalizado este proceso se analizaron en el citómetro de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson).

Electroforesis e immunodetección (Western blot)

Finalizados los diferentes tratamientos, se recogieron $4-8 \times 10^6$ células y se lisaron con un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 120 mM, Nonidet P40 al 0,5%, NaF 100 mM, ortovanadato 1mM, PMSF 40 µg/ml, aprotinina 40 µg/ml y leupeptina 40 µg/ml. Cantidad iguales de proteína analizada mediante el método de Bradford²², se sometieron a electroforesis en gelles de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE) y, posteriormente, se realizó la transferencia a membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham). Para la detección de la proteína p38 MAPK, total y fosforilada (Thr189/Tyr182), se utilizaron los correspondientes anticuerpos policlonales específicos (Cell Signaling). Los lavados entre el anticuerpo primario y el secundario se realizaron con leche en polvo al 0,25% en TBS-0,05% Tween 20. La señal se detectó mediante quimiobioluminiscencia (ECL kit RPN2108, Amersham Pharmacia Biotech).

Resultados

La inhibición de la síntesis de colesterol con SKF 104976 produce un aumento transitorio de los valores de p38 MAPK fosforilada

En primer lugar se estudió el efecto de la inhibición de la biosíntesis de colesterol en los valores pro-

teicos de p38 MAPK fosforilada. Para ello las células se incubaron en presencia de SKF 104976 y dichos valores se examinaron por *Western blot* a diferentes tiempos. Los resultados muestran un aumento transitorio de la p38 MAPK fosforilada en las primeras 36-48 h de tratamiento, para decaer posteriormente, sin cambios en la p38 total (fig. 1A).

En trabajos anteriores se había demostrado que el tratamiento con SKF 104976 producía la parada del ciclo celular en G2/M y que la adición de colesterol en ese instante restablecía la progresión del ciclo celular^{2,3,23}. Por tanto, nos planteamos estudiar el efecto de la adición de colesterol al medio de cultivo sobre la expresión de p38 MAPK. Para ello, las células se trataron con SKF 104976 1,5 μ M y a las 36 h, sin retirar el inhibidor, se añadió al medio de cultivo colesterol libre o LDL, estudiándose la expresión de p38 MAPK fosforilada y total a las 6 y 12 h posteriores. Este experimento se realizó tanto en ausencia como en presencia de nocodazol, en este último caso para impedir que las células progresaran más allá de prometáfase. Como se puede observar en la figura 1B, la adición de colesterol produjo una disminución de la forma fosforilada de p38 MAPK, más intensa con LDL que con colesterol libre, y que se acentuaba con el tiempo. Estos efectos no se debían a cambios en la cantidad de p38 MAPK total, por cuanto ésta permaneció inalterada tras la adición de colesterol libre o LDL al medio de cultivo. El nocodazol produjo ya de por sí un incremento de p38 MAPK fosforilada, lo que concuerda con resultados anteriores de otros autores²⁴, pero aun en ese caso la adición de colesterol al medio disminuyó su expresión.

La inhibición de p38 MAPK en células deficientes de colesterol acelera la entrada en fase S

La deficiencia de colesterol conseguida a través de la inhibición de la biosíntesis de colesterol por SKF 104976 en células incubadas en un medio libre de colesterol, produjo la acumulación progresiva de células en G2/M, seguido de la aparición de células poliploides al prolongar el tiempo de incubación (fig. 2). La adición de SB 203580, un potente inhibidor de las isoformas α y β de la p38 MAPK, a células que estaban siendo tratadas con SKF 104976 produjo la práctica desaparición de las células en G1 a las 12 h tras la adición de SB 203580 y el aumento de la población de células poliploides a las 24 h (fig. 2A). Estos resultados sugieren que la inhibición de p38 MAPK acelera la replicación del ADN, lo cual se sustancia también en el aumento del número de células en S1 y en S2, que sintetizan activamente ADN, como se observa en

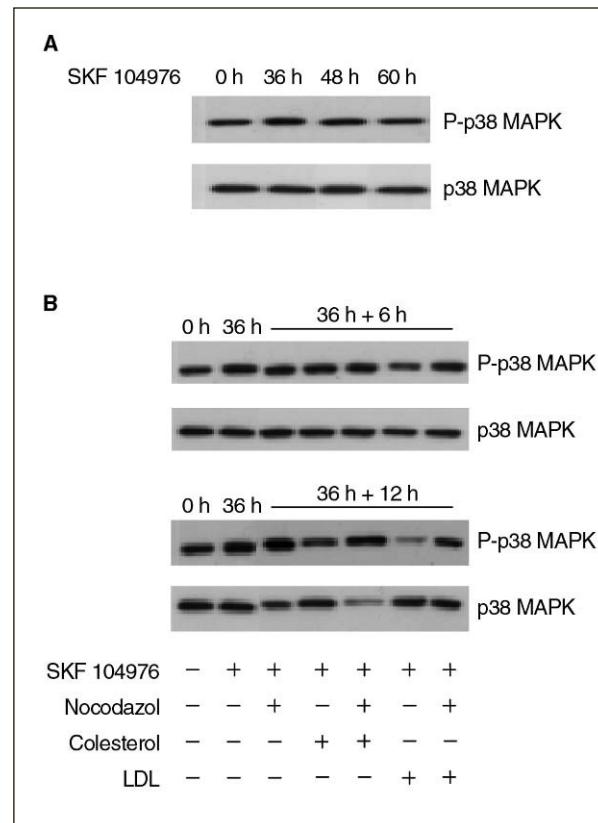


Figura 1. Valores proteicos de p38 MAPK fosforilada (P-p38 MAPK) y p38 MAPK total en células HL-60 tratadas con SKF 104976 1,5 μ M. A) Efecto del tratamiento a lo largo del tiempo. B) Efectos del colesterol libre (60 μ g/ml) y de las LDL (20 μ g colesterol/ml), aisladamente o en combinación con nocodazol 0,05 μ g/ml; las células se incubaron en presencia de SKF 104976 1,5 μ M y, a las 36 h, sin retirar el inhibidor, se añadieron el colesterol y el nocodazol en las distintas combinaciones, y se prolongó el cultivo durante 6 o 12 h. LDL: lipoproteínas de baja densidad.

los diagramas de incorporación de BrdU a las 12 y 24 h tras la adición de SB 203580 en comparación con el control (fig. 2B).

A efectos comparativos, otras células fueron tratadas con PD 98059, un inhibidor específico de ERK. Como se muestra también en la figura 2, la inhibición de la vía de ERK produjo la disminución del número de células en las fases S1 y S2 en comparación con la situación control, lo cual es compatible con una inhibición de la entrada en S tanto desde G1 como desde G2/M. Este efecto es opuesto al ejercido por SB 203580.

La inhibición de p38 MAPK no afecta la división celular

En esta ocasión las células fueron incubadas durante 40 h en presencia de SKF 104976 y a conti-

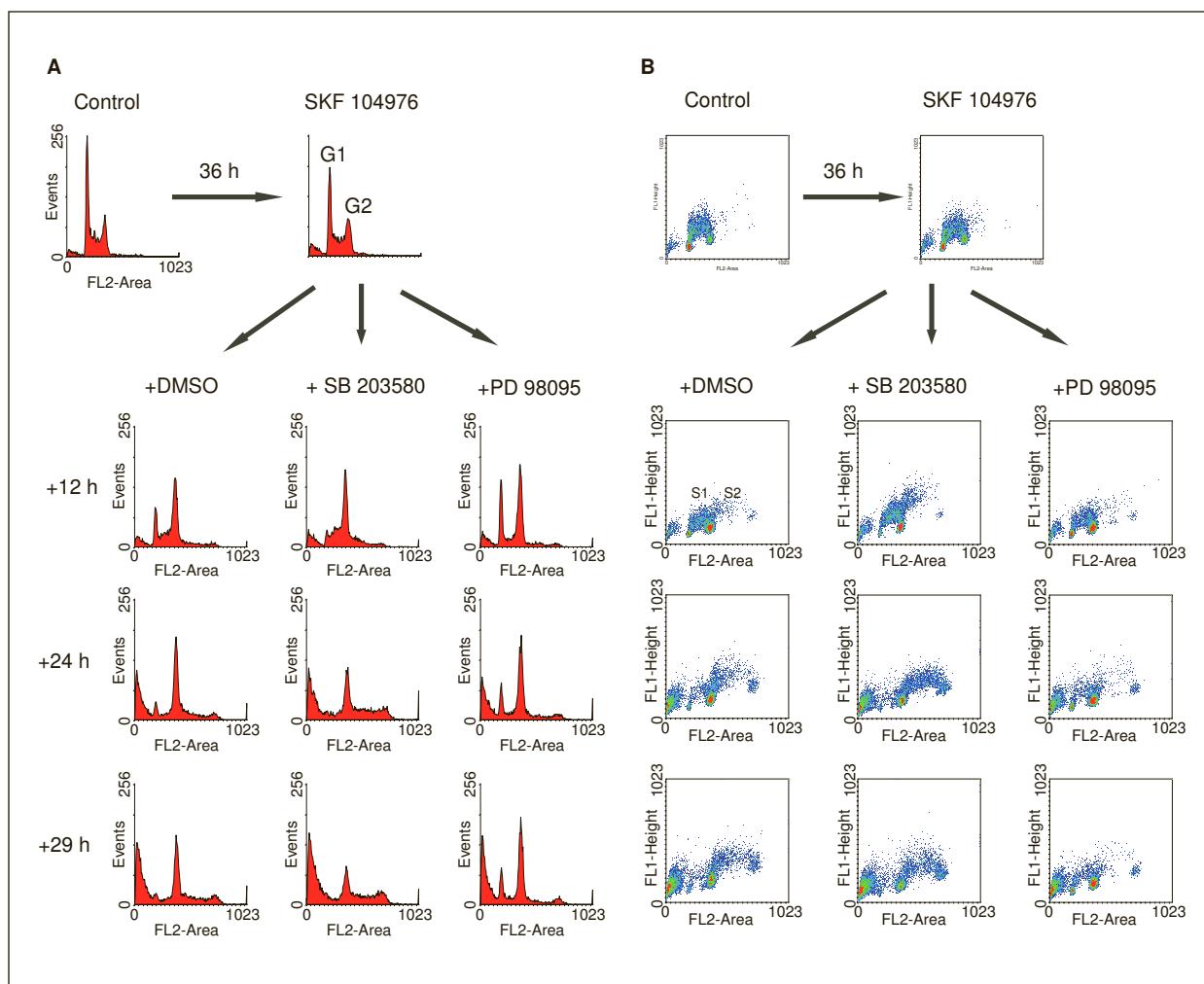


Figura 2. Efecto de la adición de SB 203580 20 μ M y PD 98095 50 μ M a células HL-60 previamente tratadas con SKF 104976 1,5 μ M sobre el ciclo celular (A) y la incorporación de BrdU al ADN (B). DMSO: dimetilsulfóxido.

nuación se añadieron al medio LDL, en ausencia o en presencia de SB 203580. Como se esperaba, el aporte de colesterol en forma de LDL evitó que progresara la parada del ciclo celular inducido por el SKF 104976, es más, las células anteriormente en G2/M se dividieron y aparecieron en G1, restableciéndose un ciclo celular normal a las 24 h tras su adición al medio (fig. 3). La inhibición de p38 MAPK no afectó la división celular, por cuanto las células incubadas con LDL no se acumulaban en G2/M a pesar de seguir estando presente el inhibidor de la biosíntesis de colesterol. Esto significa que la inhibición de p38 MAPK no interfiere en la finalización de la mitosis. Por el contrario, SB 203580 incrementó el número de células en fase S y ligeramente también el número de células poliploidicas con respecto a los cultivos con LDL solas.

La inhibición de la vía de p38 MAPK en células tratadas con nocodazol no impide el restablecimiento del ciclo celular

En una última aproximación para determinar si la vía de p38 MAPK participa en la finalización de la mitosis, las células fueron tratadas con nocodazol para detenerlas en prometafase, como resultado de la inhibición de la formación de los microtúbulos. Como se muestra en figura 4, el tratamiento con nocodazol durante 12 h produjo la acumulación de las células en G2/M, aunque también murió la célula. Una vez retirado el nocodazol del medio, las células volvieron a ciclar libremente, restableciéndose el ciclo celular. La adición de SB 203580 una vez retirado el nocodazol, no impidió que las células anteriormente detenidas en G2/M completaran la mitosis, apareciendo en G1, no habiendo

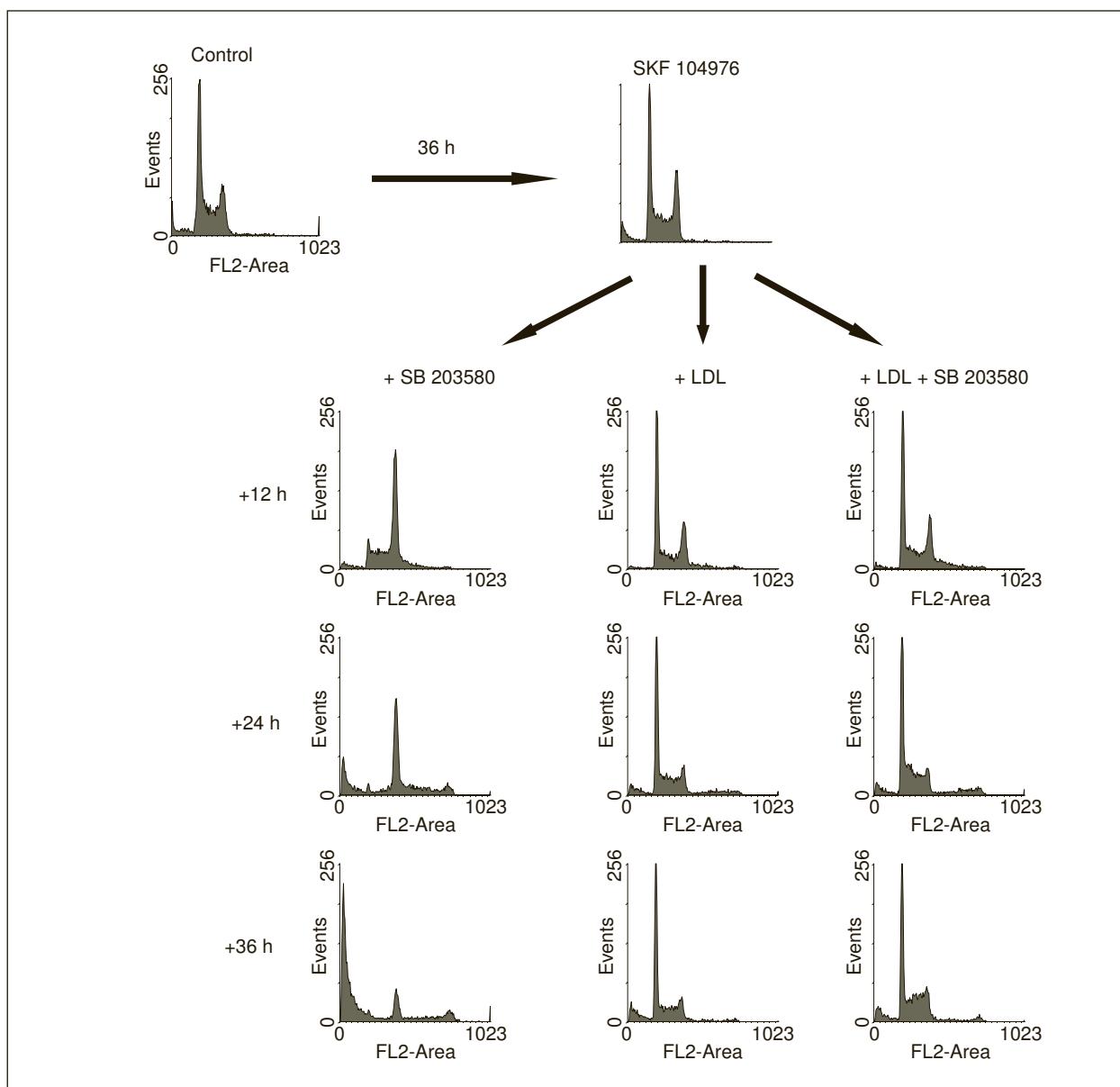


Figura 3. Efecto de la adición de SB 203580 20 μ M y colesterol LDL 20 μ g/ml, solos o en combinación, a células HL-60 previamente tratadas durante 36 h con SKF 104976 1,5 μ M. LDL: lipoproteínas de baja densidad.

prácticamente diferencias entre los histogramas de estas 2 condiciones a las 6 h después de haber retirado el nocodazol (fig. 4). Posteriormente, las células expuestas al inhibidor de p38 MAPK siguieron ciclando, pero de forma aún más acelerada que las controles, como lo muestra el incremento de la proporción de células en S a las 10 y 24 h del experimento (fig. 4).

Estos resultados son coherentes con los mostrados en las figuras anteriores y, en conjunto, indican que p38 MAPK actúa como un regulador de la en-

trada en la fase de síntesis de ADN, pero no parece participar en la finalización de la mitosis.

Discusión

Las células disponen de diversas vías de señalización que les permiten responder a las señales extracelulares y a los cambios en el estado de la propia célula. Una de ellas es la vía de p38 MAPK, que se activa bajo diferentes condiciones de estrés y media distintas respuestas metabólicas y del ciclo celular^{11,12,25,26}. En este contexto, el objetivo princi-

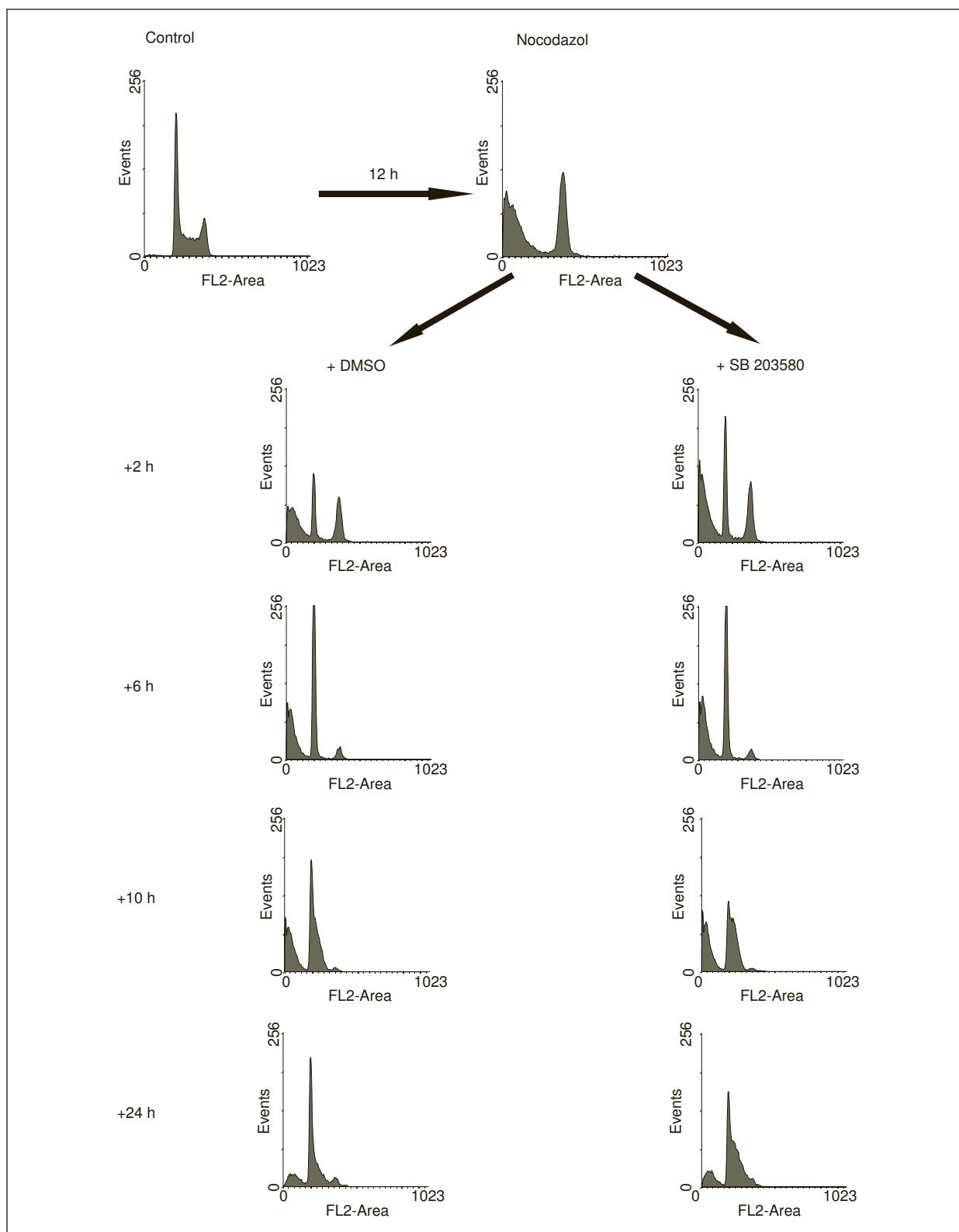


Figura 4. Efecto de la inhibición de p38 MAPK sobre la culminación de la mitosis y la posterior entrada en fase S. Las células HL-60 fueron sincronizadas en prometáfase por el tratamiento con nocodazol 0,05 µg/ml, que posteriormente se retiró, dejándose proseguir en el ciclo en ausencia (DMSO) o en presencia de SB 203580 20 µM. DMSO: dimetilsulfóxido.

pal del presente trabajo ha sido determinar la participación de esta vía de señalización en los cambios en el ciclo celular provocados por la deficiencia de colesterol.

En las células leucémicas HL-60, la inhibición de la biosíntesis de colesterol con SKF 104976, un inhibidor de la lanosterol 14 α -desmetilasa, produjo una acumulación inicial de las células en G2/M, ya detectable a las 36 h de tratamiento, seguida de la formación de células poliploides al prolongar la incubación. Estos resultados coinciden con observaciones anteriores publicadas por nosotros¹, que demostraban que el colesterol es necesario para la transición de G2 a mitosis y también para la citocinesis. Las células polinucleadas se producen, en este caso, por endorrepliación como consecuencia de la entrada en una nueva fase S (S2) de las células que no han experimentado la citocinesis¹.

El ciclo celular está regido por una serie de controles (*checkpoints*) que garantizan que las distintas etapas del ciclo discurren de una forma ordenada y evitan que se transmitan alteraciones o defectos en la dotación celular a las células hijas. Estos controles actúan en distintas etapas y su activación detiene el avance del ciclo para permitir que se reparen las alteraciones y, si no, abortar la división celular. La poliploidía que se observa en las células deficientes de colesterol debe interpretarse, entonces, como un fallo en alguno de dichos controles, puesto que se produce la replicación del ADN en una célula con contenido genético 4n que no se ha dividido.

En el presente trabajo se ha observado que, coincidiendo con la acumulación de células en G2/M, entre las 36 y las 48 h de tratamiento con el inhibidor de la biosíntesis de colesterol, se produce un incremento de la fosforilación de p38 MAPK. Esta activación era específica, puesto que se revertía al añadir colesterol al medio, lo que permite concluir que la deficiencia de colesterol se percibe por la célula como un estrés que dispara esta vía de señalización. La activación de p38 MAPK era transitoria, y coincidiendo con el descenso de los valores intracelulares de p38 MAPK fosforilada empezó a apreciarse de forma clara la formación de células poliploides. Esto sugería que p38 MAPK estaba actuando como un *checkpoint*, papel que ya le habían asignado otros autores^{10,12}, pero en este caso evitando la endorrepliación en las células que, debido a su deficiencia de colesterol, no podían completar la citocinesis. Para demostrar esta posibilidad, las células se trataron con un inhibidor específico de p38 MAPK, SB

203580, que inhibe la señalización posterior²⁷. Pues bien, este compuesto aceleró la endorrepliación, como lo indicaban el incremento del número de células que entraban en S2 desde G2/M a tiempos cortos tras su adición y la aparición posterior de células con contenido genético 8n. Por lo tanto, todo indica que p38 MAPK actúa como un control que impide que las células repliquen su ADN desfasadamente. Otros autores habían observado que la exposición de las células a distintos tipos de estrés activaba p38, retrasando la entrada en mitosis^{10,12}. En nuestro caso, p38 media la respuesta celular a la deficiencia de colesterol. La aparición de alguna célula poliploide por efecto del tratamiento con el inhibidor de la biosíntesis de colesterol debe interpretarse, por tanto, como un fracaso parcial de este control, siendo, de hecho, como fue la activación de p38 MAPK transitoria. Las causas de que dicha activación de p38 MAPK no fuera sostenida en el tiempo se desconocen. Es conocido que las células HL-60, como muchas otras células tumorales, no expresan o expresan formas mutantes de p53, un importante gen supresor de tumores. En estas células, la respuesta al estrés, por ejemplo al daño en el ADN, descansa en la activación de p38 MAPK^{13,28}, lo que confirma a p38 MAPK como gen supresor de tumores¹². Por otro lado, se ha demostrado que la activación de p38 MAPK en respuesta a ciertos tóxicos químicos requiere p53²⁹. Por lo tanto, esta interrelación entre p53 y p38 puede explicar el hecho de que las células carentes de p53, como las HL-60, no puedan mantener activa p38 MAPK en respuesta a la deficiencia de colesterol.

Los resultados del presente trabajo no aclaran si la interrupción de la citocinesis como consecuencia de la falta de colesterol está mediada por la activación de p38 MAPK. Su demostración exigiría la utilización de células que carecieran de p38 MAPK o de alguno de los otros componentes de esta vía. Aun así, nuestros resultados indican que no se requiere p38 MAPK para que se complete la citocinesis. Así lo evidencian los experimentos de reposición del colesterol a células tratadas con SKF 104976, donde se observa que la adición de LDL permite que las células se dividan, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de p38 MAPK. En el mismo sentido, SB 203580 tampoco afectó el avance por mitosis y la división de las células previamente sincronizadas en prometafase con nocodazol. Estos resultados no se contradicen con el papel que recientemente se le ha asignado a p38 MAPK en la regulación de la entrada en mitosis desde G2, donde actuaría como *checkpoint*^{13,19}.

En el presente trabajo también se ha observado que la vía de ERK no es necesaria para que se complete la citocinesis, en tanto y en cuanto la inhibición de dicha proteína no impide que las células tratadas con SKF 104976 se dividan normalmente tras la adición de colesterol (LDL) al medio. En la bibliografía hay cierta controversia acerca del papel de ERK en mitosis. Mientras que algunos autores observan que la inhibición de ERK1/2 en G2 reduce el número de células que entran en mitosis³⁰ o, si es en metafase/anafase o en telofase impide la abscisión celular³¹, otros aseguran que ERK1/2 no es necesaria para la entrada y salida de las células de mitosis, aunque sí es fundamental para el comienzo de G2³². Hayne et al³⁰ han propuesto incluso que p38 MAPK podría inhibir ERK al comienzo de mitosis y permitir así la progresión a través de esta fase.

El papel de las vías de ERK y de p38 MAPK en la entrada en S parece más claro. Ya se ha comentado que la inhibición de p38 MAPK aceleró la entrada en S2 de las células 4n que no podían dividirse por falta de colesterol, lo que conducía a la formación de células poliploides. La inhibición de p38 MAPK en las células en fase G1, con contenido genético 2n, también aceleró su entrada en fase S, como se observó tanto en las células tratadas con SKF 104976 suplementadas con LDL como en las liberadas desde prometafase tras el lavado del nocodazol. Estos efectos subrayan el papel de p38 MAPK reteniendo la replicación del ADN, ya conocido^{8,11,12,33}. Por el contrario, la inhibición de ERK con PD 980359 impidió la entrada en fase S. Este resultado coincide con otros publicados anteriormente por otros autores y señala el papel de ERK para la superación del punto de restricción que antecede la transición de G1 a S³⁴. Por tanto, las rutas de p38 MAPK y de ERK1/2 regulan de manera opuesta la fase de síntesis de ADN, inhibiéndola y favoreciéndola, respectivamente.

En conclusión, los resultados demuestran que la inhibición de la biosíntesis de colesterol impide la citocinesis, lo que hace que las células se acumulen inicialmente en G2/M. Simultáneamente se activa p38 MAPK, que impide la replicación del ADN. No obstante, esta activación de p38 MAPK no se sostiene en el tiempo, probablemente por la deficiencia de p53 que afecta a las células HL-60, lo que conduce a que las células progresen a poliploidía por un mecanismo de endorreplicación. En conjunto, estos resultados ilustran el papel del colesterol en la progresión del ciclo celular y la respuesta de las células ante su deficiencia activando vías de estrés.

Bibliografía

1. Fernández C, Lobo MV, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Exp Cell Res.* 2004;300:109-20.
2. Fernández C, Martín M, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res.* 2005;46:920-9.
3. Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *Faseb J.* 1999;13:1359-70.
4. Suárez Y, Fernández C, Ledo B, Ferruelo AJ, Martín M, Vega MA, et al. Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription: Sterol specificity for cell cycle progression in human cells. *Eur J Biochem.* 2002;269:1761-71.
5. Ng MM, Chang F, Burgess DR. Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis. *Dev Cell.* 2005;9:781-90.
6. Bengoechea-Alonso MT, Punga T, Ericsson J. Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:11681-6.
7. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. *Cell Cycle.* 2006;5:1708-18.
8. Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis J. The stress activated protein kinase pathway. *Cancer Surv.* 1996;27:127-38.
9. Mehta KD, Miller L. Inhibition of stress-activated p38 mitogen-activated protein kinase induces low-density lipoprotein receptor expression. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9:201-5.
10. Pearce AK, Humphrey TC. Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol.* 2001;11:426-33.
11. Dmitrieva NI, Bulavin DV, Fornace AJ Jr, Burg MB. Rapid activation of G2/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:184-9.
12. Bulavin DV, Fornace AJ Jr. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.* 2004;92:95-118.
13. Mikhailov A, Shinohara M, Rieder CL. The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephase and entry into mitosis. *Cell Cycle.* 2005;4:57-62.
14. Lavoie JN, L'Allemand 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;271:20608-16.
15. Casanovas O, Miró F, Estanyol JM, Itarte E, Agell N, Bachs O. Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J Biol Chem.* 2000;275:35091-7.
16. Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, et al. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature.* 2001;411:102-7.
17. Ellinger-Ziegelbauer H, Kelly K, Siebenlist U. Cell cycle arrest and reversion of Ras-induced transformation by a conditionally activated form of mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Cell Biol.* 1999;19:3857-68.
18. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 2005;19:1175-87.
19. Cha H, Wang X, Li H, Fornace AJ Jr. A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *J Biol Chem.* 2007;282:22984-92.
20. Kumar A, Middleton A, Chambers TC, Mehta KD. Differential roles of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and p38(MAPK) in interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha-induced low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1998;273:15742-8.
21. Mayer RJ, Adams JL, Bossard MJ, Berkhouit TA. Effects of a novel lanosterol 14 alpha-demethylase inhibitor on the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in Hep G2 cells. *J Biol Chem.* 1991;266:20070-8.

22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
23. Suárez Y, Fernández C, Ledo B, Martín M, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Sterol stringency of proliferation and cell cycle progression in human cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1734:203-13.
24. Takenaka K, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science*. 1998;280:599-602.
25. Kurata S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem*. 2000;275: 23413-6.
26. Lemaire M, Froment C, Boutros R, Mondesert O, Nebreda AR, Monsarrat B, et al. CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle*. 2006;5:1649-53.
27. Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:825-31.
28. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*. 2007;11:175-89.
29. Kwon YW, Ueda S, Ueno M, Yodoi J, Masutani H. Mechanism of p53-dependent apoptosis induced by 3-methylcholanthrene: involvement of p53 phosphorylation and p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2002;277:1837-44.
30. Hayne C, Tzivion G, Luo Z, Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem*. 2000;275:31876-82.
31. Kasahara K, Nakayama Y, Nakazato Y, Ikeda K, Kuga T, Yamaguchi N. Src signalling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J Biol Chem*. 2007;282:5327-39.
32. Shinohara M, Mikhailov AV, Aguirre-Ghiso JA, Rieder CL. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity is not required in mammalian cells during late G2 for timely entry into or exit from mitosis. *Mol Biol Cell*. 2006;17:5227-40.
33. Chakravortty D, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Mu MM, Yoshida T, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase augments lipopolysaccharide-induced cell proliferation in CD14-expressing Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun*. 2001;69: 931-6.
34. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007;26:3227-39.