

Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos

(Cell cycle: regulatory mechanisms and biochemical markers)

SILVIA H. RABENHORST¹; ROBERTO C. BURINI²; FERNANDO C. L. SCHMITT³

Resumo

Os mecanismos reguladores do ciclo celular e sua inter-relação com fatores de crescimento, oncogenes e anti-oncogenes têm se constituído nas áreas de maior avanço no estudo da biologia do câncer. Continuamente estão sendo descobertas novas proteínas envolvidas no complexo mecanismo que desencadeia as diferentes fases do ciclo celular, como também os seus mecanismos de ativação. A descoberta dessas proteínas e co-fatores que regulam as transições G1/S e G2/M e que atuam na replicação do material bem como o papel dos proto-oncogenes dentro do ciclo celular permitiu aumentar o conhecimento sobre as células ciclizantes como também, permitiu que estas pudessem ser detectadas mesmo sem a visualização de figuras mitóticas. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra estas proteínas tornou viável o estudo, em larga escala, de taxas de proliferação celular em diferentes neoplasias, uma vez que substâncias como Ki67, polimerase alfa e PCNA – Ciclina somente são expressas em células em proliferação. A detecção de células proliferativas permite, através de sua contagem, estimar as taxas do crescimento neoplásico com conseqüente repercussão no prognóstico da doença e na terapêutica do paciente. Neste artigo são revistos os mecanismos de controle do ciclo celular bem como os métodos de detecção de células proliferativas, enfatizando a aplicação de marcadores pela sua praticidade e confiabilidade.

Unitermos: Ciclo celular, célula proliferativa, marcadores do ciclo celular, proto-oncogenes

Introdução

Proliferação é definida como aumento do número de células resultantes da complementação do ciclo celular. Fatores extracelulares determinam se uma célula crescente começará a proliferar e se também uma célula proliferativa normal em G1, irá continuar no ciclo ou reverter para a quiescência.

No câncer, o controle de proliferação é desregulado. Estudos de células neoplásicas e normais, bem como o uso de modelos de sistemas indo desde leveduras às células de mamíferos têm sido usado para identificar os eventos regulatórios significantes. A distinção entre células quiescentes e células que estão ciclizando é de grande relevância, já que a taxa de aumento da população é primariamente dependente da fração de células que estão no ciclo, sendo que os eventos dentro do ciclo que se seguem ao G1 tardio (S, G2 e M), ou seja, posterior às respostas aos sinais externos, processam-se independentes destes (13, 35). Por outro lado, a cada dia, o número de proto-oncogenes cresce, e suas funções começam a ser elucidadas, sendo muitos deles envolvidos direta ou indiretamente com o controle de ciclo celular.

Dessa maneira, o bom entendimento das etapas do ciclo celular e dos mecanismos reguladores apresenta grande interesse médico-diagnóstico, particularmente nas doenças neoplásicas, onde há, na maioria delas, grande aumento de células ciclizantes, independentemente das causas primárias da doença. Em vista disso, este artigo revisa o ciclo celular, levando em consideração alguns aspectos moleculares envolvidos e alguns dos marcadores utilizados para a detecção de células proliferantes.

Histórico

No início desse século o ciclo celular já era estabelecido em duas fases principais: a interfase e a mitose. Atualmente, estabelecendo-se um princípio de organização, o ciclo celular é freqüentemente considerado como sendo composto de 4 fases: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período depois da replicação do DNA (G₂) e a fase mitótica, que culmina com a divisão celular (Figura 1).

Embora os eventos básicos do ciclo celular já fossem identificados, poucos eram conhecidos, até re-

1 Aluna do curso de PG em Ciências Biológicas, AC: Genética, UNESP - IB, Botucatu (SP).

2 Professor Titular do Departamento de Clínica Médica, UNESP - Faculdade de Medicina, Botucatu (SP), CEP: 18610. A quem toda correspondência deverá ser endereçada.

3 Prof. Assist. Doutor do Departamento de Patologia, UNESP - Fac. Medicina, Botucatu (SP).

centemente, a respeito dos mecanismos moleculares que regulavam esse ciclo. Com os conhecimentos moleculares, fica claro que as formulações sobre a divisão ou fases do ciclo celular devem ser vistas mais cuidadosamente, pois ele é bem mais complexo. Dentro dele é montado um grande número de macromoléculas, ativadas ou movidas em seqüências altamente organizadas, envolvendo mais que um estágio do ciclo celular, e reguladas por vias bioquímicas evolutivamente bem conservadas, que atuam como relógios químicos.

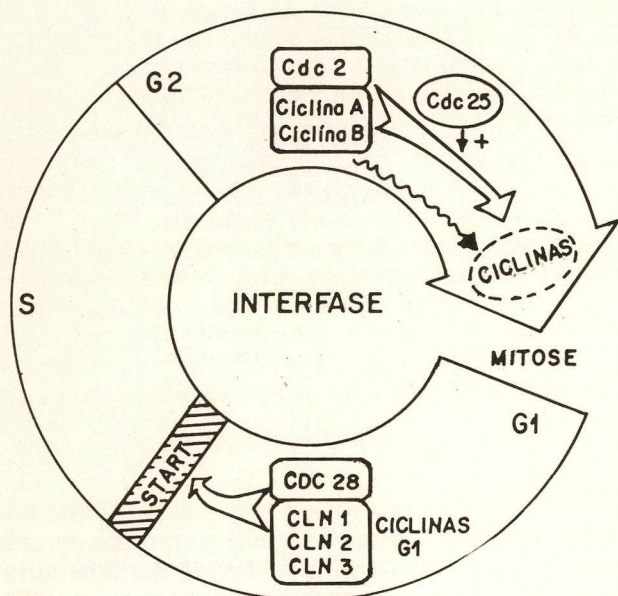


Figura 1 - Modelo esquemático do ciclo celular indicando, ao centro, as proteínas envolvidas nos dois principais passos regulatórios: o da entrada na mitose e o "start" (**), onde a célula "decide" replicar o DNA. Os anéis ao redor indicam as fases nas quais os marcadores de células em proliferação mais utilizados estão presentes. A região do anel com marcação diferente indica o pico da detecção desses marcadores.

Regulação do Ciclo Celular

O ciclo celular é seletivamente regulado. Os eventos são ordenados em passos dependentes, nos quais a iniciação do evento posterior é também dependente da complementação dos eventos anteriores. Os mecanismos controladores obrigando à dependência, no ciclo celular, foram chamados por Hartwell & Weinert [17] do "check points".

Nessa linha de pensamento de um sistema linear, onde a complementação de um evento seria requerida para engatilhar o próximo evento (linha genética-dominó), Hartwell [16], em experiências com *Saccharomyces cerevisiae*, identificou formas mutantes que paravam em um ponto de ciclo celular. Cada

mutação refletia uma alteração em um gene, cujo produto era crítico para passar do ponto de parada. Esses genes cruciais são conhecidos agora coletivamente como "cell-division-cycle" (cdc).

Regulação da entrada na fase mitótica

Um dos passos regulatórios mais bem estudados é o que ocorre do período G2 tardio. Os estudos se iniciaram com a descoberta, independentemente, por Massui & Market [27] e Smith & Ecker [40], de uma atividade citoplasmática denominada MPF (fator promotor de maturação ou mitose), capaz de controlar a entrada da célula na mitose e na meiose. Nas células em interfase, a atividade do MPF desaparece [3], sendo necessária uma outra proteína sintetizada durante a interfase, para a ativação desse fator, durante a mitose.

Paul Nurse e cols. [34], em estudos similares ao de Hartwell [16], trabalhando com *Schizosaccharomyces pombe*, o qual tem ciclo celular muito relacionado com o de mamíferos, identificaram um gene, o *cdc2*, no qual certas mutações resultaram na produção de uma proteína inativa que prevenia a entrada da célula na mitose. Essa proteína, denominada *p34^{cdc2}* (Figura 1), é uma proteína serina-treonina quinase altamente conservada [35] e tida agora como essencial para a mitose de todos os eucariotos [34]. As quinases são enzimas que transferem grupos fosfatos do ATP para as proteínas. Sabe-se, atualmente, que a adição e a remoção de fosfatos constituem o principal meio de regulação da atividade de proteínas celulares [18, 34]. Vários grupos usando diferentes métodos demonstram que a proteína *p34^{cdc2}* é um componente do MPF [8, 10, 11]. No entanto, em todos os tipos de estudos a concentração de *p34^{cdc2}* manteve-se constante através do ciclo celular. Desta forma, um outro componente do MPF é quem deveria ser o responsável pela ativação do *p34^{cdc2}*, que, conseqüentemente, regularia o MPF.

No início dos anos 80, Tim Hunt e cols. *apud* Murray & Kirschner [32], em experiências com ovos de ouriço-do-mar, identificaram um produto protéico, que, ao contrário dos demais, desaparecia abruptamente em cada mitose, sendo acumulado novamente na interfase. Este produto foi denominado de *ciclina*. Hoje é sabido que a ciclina é o segundo componente do MPF, participando na ativação do *p34^{cdc2}* e, portanto, do MPF. A observação feita por Murray & Kirschner [32], de que a ciclina se acumula na interfase e é abruptamente destruída no final da mitose, levou-os a propor que a célula não pode ser capaz de completar a mitose até que a ciclina seja consumida. Quando os autores induziram extratos de ovos de rá a fazerem uma ciclina, a qual induzia à mitose mas não poderia ser degradada, os extratos perderam o poder de completar a divisão celular e permaneceram em mitose.

Outras proteínas envolvidas no controle dessas modificações têm sido genética e bioquimicamente identificadas. Uma delas, determinada pela expres-

são do gene *cdc25*, uma fosfoproteína ($p80^{cdc25}$) acumulada na interfase, com pico na metáfase, em *Schizosaccharomyces pombe*, induz à mitose pela ativação da proteína quinase $p34^{cdc2}$ [29]. É importante ressaltar que, embora a quinase *cdc2* seja a reguladora central do ciclo celular em células eucarióticas e que as moléculas que a modificam sejam aparentemente as mesmas em todas as células, os detalhes de como a quinase é regulada variam de organismo para organismo e de célula para célula em um mesmo organismo. Em alguns casos a *cdc25* pode controlar a ativação do complexo ciclina-*cdc2*; em outros, a ciclina pode controlar a ativação.

- Modelo para o controle de mitose

Com base nos dados acima descritos, Murray & Kirschner [32] propuseram um modelo para o controle da mitose, em ovos de rã: o acúmulo da ciclina na interfase, apesar de produzida continuamente no ciclo celular, faz com que este se combine, nesta fase, com molécula *cdc2*, cujo nível é mantido constante todo o ciclo, formando o chamado *pré-MPF*, cuja forma ainda não é ativa, ou seja, ela não pode transferir grupos fosfatos para proteínas e não pode induzir à mitose. O *pré-MPF* é convertido em ativo por enzimas como a *cdc25*. Uma vez ativado, o MPF, direta ou indiretamente, inicia os eventos da mitose.

A perda da atividade da quinase *cdc2* no final da mitose depende da destruição da ciclina [9]. Quando a atividade do complexo *cdc2*-ciclina excede certos níveis, ela engatilha uma série de reações que levam à proteólise da própria ciclina. A mitose termina quando o nível da ciclina declina cerca de três vezes [12]. Logo após, fosfatases revertem a fosforilação dos substratos protéicos, resultando no restabelecimento das estruturas da interfase.

Regulação da entrada na fase S

Dentro de um complexo modelo do controle do ciclo celular, agora já se sabe que em células somáticas a decisão de replicar o DNA é altamente regulada [17, 31].

Análise de mutantes tem revelado como as células mantêm um tamanho médio constante através de muitas divisões celulares. Essa regulação do tamanho requer que os contínuos eventos do ciclo celular, referidos como "crescimento celular", sejam coordenados passo a passo com os eventos do ciclo. Esses processos são coordenados em um ponto chave, no início do ciclo celular, dentro da interfase, no período G1, identificado primeiramente por Hartwell [17] e denominado "*start*" (Figura 1).

A regulação através do *start* é muito mais controlada que a passagem para entrar em mitose. Novamente o processo depende da ativação da proteína quinase codificada pelo gene *cdc2*, em *S. pombe*, ou pelo gene *CDC28* ($p34^{cdc28}$), um homólogo funcional do *cdc2*, nas leveduras. A especificidade desta quinase é devido às modificações de sua atividade pela

fosforilação ou defosforilação de sítios específicos e dependentes de acúmulo de ciclina. Entretanto, a ciclina envolvida no *start* não é a mesma envolvida na mitose. Existem classes diferentes de ciclina que regulam a entrada das células em mitose e a replicação do DNA. As ciclinas mitóticas têm sido divididas em duas classes: as ciclinas tipo A e tipo B, com base na homologia da seqüência dos 200 aminoácidos mais bem conservados (*cyclin box*) dos cDNAs clonados de uma variedade de organismos [9, 19, 36]. Recentemente foram descritas as ciclinas CLNsd ou ciclinas G1 em levedura e três genes redundantes foram identificados: CLN1, CLN2, CLN3, os quais estão envolvidos na ativação *CDC28* e, portanto, na passagem pelo *start* [8, 33].

Motokomura e cols [30] observaram que um gene, o PRD1, o qual é superexpressado em uma forma rara de tumor benigno da paratireóide, é semelhante ao gene da ciclina. Os níveis do mRNA do PRD1 variam através do ciclo celular, tendo picos em G2 ou G1, e sua proteína tem similaridades significativas com todos os três tipos de ciclina, sendo esse gene forte candidato a ser gene de uma ciclina humana.

O movimento através do *start* é também controlado indiretamente por nutrientes, hormônios e fatores de crescimento, que atuam anteriormente, ou seja, no G1 precoce. Os estágios do ciclo celular que se seguem ao G1 tardio (S, G₂ e M) processam-se independente de fatores externos. Os fatores de crescimento polipeptídeos estimulam a célula a proliferar, ligando-se a receptores específicos localizados na membrana das células. Essas proteínas receptoras são dessa forma ativadas a transmitir um sinal de transdução [18, 35]. Um domínio intracelular do receptor, com atividade quinase, poderá ser ativado a modificar segundos mensageiros, os quais, então, transmitem o sinal através do citoplasma até o núcleo. Várias moléculas podem funcionar como segundos-mensageiros, tais como proteínas fosforiladas, pequenos íons, incluindo cálcio e hidrogênio e pequenas moléculas como o AMP cíclico e o inositol fosfato [13]. Segundos-mensageiros podem ativar a expressão de genes específicos, mais precisamente através de proteínas que se ligam às seqüências gênicas regulatórias por exemplo: células quiescentes estimuladas a proliferar começam, dentro de minutos, a expressar os proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*. Juntas estas proteínas formam um complexo de ativação transcricional ligando-se a seqüências específicas de DNA. Similarmente, depois de uma hora de estimulação, ocorre a síntese do produto do *c-myc*, um fator transcricional. Acredita-se que estes genes de respostas inicial controlam a expressão de outros produtos gênicos requeridos para o primeiro passo, para a saída da quiescência e entrada na fase S. A esses primeiros eventos caracterizando sub-fases que permitam a passagem de células da fase G₀ para G1-S, são referidas como "estados de competência", os quais são necessários para repor mRNAs e proteínas específicas perdidas durante a quiescência, os quais desencadeiam processos que incluem a síntese

se de algumas proteínas num segundo ponto (G1 tardio), necessários para a progressão do ciclo celular [13].

Fase S

Após sua passagem pelo *start*, a célula entra no período denominado "fase S". Durante este período do ciclo celular todo o conteúdo do DNA no núcleo precisa ser, completa e precisamente, replicado em um período de poucas horas. Isto é conseguido pela iniciação da replicação bidirecional de múltiplos sítios ao longo de cada cromossomo. Uma simples forquilha de replicação trabalha na taxa de 3 kb por minuto, o que requereria cerca de um mês para replicar um cromossomo médio humano contendo 40 mm de DNA^{2L}. Desta forma, o padrão de iniciação de um único cromossomo precisa ser regulado espacial e temporariamente para assegurar completa e precisa replicação dentro da fase S. Deve-se também levar em conta que a replicação cromossômica envolve mais do que a replicação do DNA. Toda e complexa arquitetura do cromossomo também deve ser duplicada.

Proteínas envolvidas na replicação

Um pré-requisito para se entender como a replicação celular é controlada nos eucariotos é a identificação de proteínas que estão diretamente envolvidas na replicação do DNA, particularmente na sua regulação (Figura 1).

1) Polimerases

Em contraste com as polimerases bacterianas, também atividade exonucleotídica, a maioria das polimerases das células eucarióticas possuem somente a atividade DNA sintetizadora [25]. A polimerase-alfa era aceita como principal polimerase envolvida na replicação do DNA. Uma objeção ao fato da polimerase-alfa ser considerada como enzima replicadora, a única seria a falta, nesta enzima, da atividade exonuclease 3'-5', remove os paramentos nucleotídicos errados diretamente após terem sido adicionados. Em 1976, Byrnes e col. [7] isolaram uma nova DNA polimerase eucariótica, a qual chamaram de delta. Eles distinguiram a polimerase-alfa da delta por alguns critérios, dentre eles: a atividade exonuclease 3'-5' e as massas moleculares relativamente diferentes [24].

Experimentos para avaliar a contribuição relativa das DNA polimerase-alfa e delta na replicação cromossômica mostraram que a atividade polimerase coordenada, aumentando na fase S [2, 3]. Contudo, a DNA polimerase-delta parece ter uma maior contribuição no total da replicação. A DNA polimerase-alfa associada a co-fatores é a responsável pela síntese da fita descontínua, e a DNA polimerase-delta é a responsável pela síntese da fita contínua (de DNA). À polimerase-alfa tem sido atribuída uma função po-

tencial, no estágio de iniciação, com atividade DNA-primase [2].

2) Co-fatores

Dentre os co-fatores que participam diretamente da replicação do DNA destaca-se uma proteína nuclear, presente somente em células proliferativas, a qual é descrita, independentemente, por Miyachi et al. [28] e Bravo & Celis [5]. Essa proteína, denominada como antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), foi também designada como ciclina em virtude de seu aparecimento cíclico. Entretanto, à luz dos estudos atuais, vale lembrar que essa proteína não está bioquimicamente relacionada com as ciclinas discutidas anteriormente. A PCNA possui uma massa molecular relativa de 36.000 (36 kb), com alta homologia dos genes para a PCNA/ciclina nos reinos vegetal e animal [42]. Recentemente foi identificada como co-fator da polimerase-delta, necessário à síntese de DNA e, portanto, à progressão do ciclo celular [4, 21, 23, 38, 43], sendo que para sua função esta proteína requer ATP. A adição de um oligonucleotídeo anticomplementar ao mRNA da PCNA/ciclina resulta na completa cessação da síntese de DNA [21].

A subsequente identificação de um fator replicador RF-C (ou provavelmente fator ativador-A1) contribuiu para a sugestão de que ambas as polimerases (alfa e delta) funcionam cooperativamente durante a replicação. A RF-C é uma proteína de ligação inicial ATP-ase DNA dependente que altera a atividade da DNA polimerase alfa e delta. A atividade ATP-ase do RF-C é estimulada pelo PCNA. A ausência de PCNA ou RF-C nas reações de replicação, resulta no acúmulo de seqüências de fitas nascentes de DNA que hibridizam com o molde descontínuo [42, 43, 44].

Outro fator requerido para a replicação é o RF-A, uma proteína de multisubunidades, também referida como SSB humana. SSB (single-stranded-DNA-binding protein) são proteínas que se ligam às fitas simples de DNA, desenrolando-as e mantendo-as separadas, possibilitando, dessa forma, as cópias das fitas moldes pelas polimerases [41]. O fator RF-A estimula ambas as polimerases alfa e delta, sendo que a estimulação da polimerase-alfa, parece ser específico. O fator RF-A é também requerido para a iniciação da replicação do DNA [21, 26].

Outras proteínas são também requeridas para a replicação, como as topoisomerases I e II, que relaxam o super enrolamento das fitas de DNA de ambos os lados da forquilha de replicação e a DNA helicase, uma proteína ATP dependente que promove a separação das duplas fitas de hélice do DNA [39].

3) Importância da p34^{cdc2}

As proteínas envolvidas na replicação do SV40 respondem diretamente ou indiretamente à fosforilação pela p34^{cdc2}, sendo a principal o Ag-T. A fosforilação do resíduo treonina 124 do Ag-T é essencial para sua habilidade de se ligar à origem e iniciar a

síntese de DNA. Contrariamente, a fosforilação ao redor dos resíduos da serina 120 ou 123, inibe a capacidade do Ag-T desenrolar a origem. Uma fosfatase, denominada PP2Ac, é capaz de remover esses fosfatos inibitórios, mas essa atividade é somente observada nas fases G1 e S. As proteínas eucarióticas SSB (RF-A) também parecem ser reguladas pela fosforilação com especificidade para o ciclo celular. Essa fosforilação "in vivo" ocorre somente durante as fases S e G2, tornando-as mais efetivas que as formas não fosforiladas e é "in vitro" um substrato para a quinase p34^{cdc2} [18].

Como o SV40 não pode replicar seu DNA até que a célula infectada entre na fase S, uma de suas funções é induzir que as células infectadas entrem nesta fase. Isto é conseguido através da ligação e modificação da atividade de duas proteínas que normalmente previnem a célula a ciclar: os tumores supressores RB e p53. Ambas proteínas são fosforiladas durante as fases S e G2 "in vivo", mas não na fase G1, e são "in vitro" substrato para p34^{cdc2}. Complexos entre p43 e p34^{cdc2}, associado à ciclina. É possível também, que a forma não fosforilada do RB possa interagir com o p34^{cdc2} ou com a ciclina [18]. Dessa maneira, o p34^{cdc2} pode estimular a entrada na fase S não somente pela fosforilação direta de proteínas essenciais para a iniciação da replicação como as SSB eucarióticas, mas também pela fosforilação, com conseqüente inativação de inibidores da replicação como são, possivelmente, p53 e RB.

Marcadores de células em proliferação

Inicialmente, a taxa de proliferação celular era avaliada pela observação das figuras de mitose, que como vimos, representa apenas uma das fases do complexo ciclo celular. Outros métodos foram posteriormente desenvolvidos com esta finalidade.

A descoberta de inúmeras proteínas que desempenham papel fundamental no ciclo celular, algumas delas revistas em parágrafos anteriores, permite que através de sua detecção, a identificação de maneira mais objetiva, das células ciclizantes. Seja por métodos radioativos ou de anticorpos monoclonais marcados, a detecção de células proliferativas permite, através de sua contagem, obter uma estimativa das taxas de crescimento neoplásico com conseqüentes repercussão no prognóstico e na terapêutica.

Marcadores detectados por anticorpos monoclonais

Dentro do contexto de se identificar as células em proliferação, atualmente algumas proteínas relacionadas com a fase replicativa têm sido utilizadas como marcadores e detectadas através de anticorpos monoclonais. Três são os mais utilizados: a polimerase-alfa, PCNA e um marcador denominado K1-67. Este foi assim designado por ter sido produzido na universidade de Kiel (Alemanha) sendo que o clone produtor de anticorpo (Ac) específico para este antígeno foi crescido na 67^a placa de cultura de tecido [6].

A natureza do antígeno reconhecido pelo anticorpo Ki-67 não está de todo estabelecida. Recentes estudos sugerem que esse antígeno seja um componente da matriz nuclear e tem sido caracterizado como uma proteína não histona de peso molecular aproximado de 345 a 395 Kd [15]. É expresso durante todo o ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas sua expressão antigênica aumenta na segunda metade da fase S, alcançando o pico máximo em G2 e M [6]. As taxas de avaliação do índice de proliferação celular usando-se anticorpos monoclonais, encontrados comercialmente, contra o antígeno Ki-67 como marcadores, são comparáveis com aquelas dos métodos tradicionais [6]. Sabe-se que a expressão antigênica do Ki-67 é influenciada por aspectos nutricionais.

Poucos são os trabalhos que utilizam anticorpos monoclonais anti-polimerase alfa e raros os que utilizam esse Ac em material de rotina [41]. O Ac utilizado reconhece uma sub-unidade de PM 77.000 a qual afeta a atividade primase dessa polimerase e é presente nas fases G1, S e G2 de células transformadas [41], sendo uma vantagem a sua expressão já no início do período G1.

Em contraste a esses dois marcadores, os quais necessitam de materiais congelados para as reações, os Ac monoclonais anti PCNA/ciclina; disponíveis comercialmente, reagem com epitopos antigênicos resistentes à fixação em Carnoy e formalina, o que facilita grandemente o seu uso em materiais colhidos rotineiramente ou em materiais de arquivos [14]. A avaliação do índice de proliferação celular usando PCNA/ciclina são comparáveis aos métodos tradicionais e por vezes até superior à métodos como o da citometria de fluxo. Recentemente foi encontrada grande identidade entre o PCNA e o Ki-67 na avaliação de algumas neoplasias, especialmente os linfomas [20], embora o pico máximo de expressão destes marcadores sejam em fases diferentes do ciclo celular.

Em contraste com os marcadores tradicionais de detecção de proliferação celular, como as contagens de mitoses e a incorporação de substância que se incorporam à fase S tais como Timidina tratada e BrdU (Bromodeoxiuridina). O uso de marcadores que aparecem nos vários estágios de ciclo celular, assegura uma detecção mais apurada das células em proliferação, já que tanto as figuras mitóticas como os marcadores que são incorporados na fase S, representam apenas uma fração de ciclo celular, fornecendo uma sub-estimativa das células potencialmente proliferativas.

Agradecimentos

Às Sras. Rosane J. Gonçalves e Valéria Maria Ricarelli de Oliveira pela digitação do texto.

Abstract

The regulatory mechanisms of the cellular cycle and its relationship with the growth factors, oncogenes and anti-oncogenes are one of the major advanced fields in the cancerbiology studies. The identification of proteins and cofactors regulating the transitions between G1/S and G1/M as well the transcription of the genetic material have allowed the detection of cycling cells even before the appearance of the mitotic signs. The development of techniques using monoclonal antibodies against those proteins have made possible studies on proliferative cells of different tumours, mainly based on fact that proteins such as alpha polymerase and cyclin/PCNA are expressed only by proliferating cells. Thus the detection and counting of these cells would allow the evaluation of either the tumor-growth rate or its therapeutic efficiency and consequently the prognostic of the disease. The present paper reviewed the current knowledge of the cell-cycle control mechanisms and the available methodology for the proliferative-cell detection emphasizing the biochemical markers, its practicability and reliability.

Key words - Cellular cycle, proliferative cell, cell-cycle markers, proto-oncogenes.

Bibliografia

- ADDISON, C., JENKINS, J. R., STRIRZBECKER, N. W. The p53 nuclea localization signal in structurally unked to p34^{cdc2} kinase mothy. *Oncogenes* 5:423-426, 1990
- BASNAKIAN, A., BENFALVI, G., SARKAR, N. Contribution of DNA polimerase delta to DNA replication in permeable CHO cells synchronized in S phase. *Nucleic Acid Res.* 17:4757-4767, 1989.
- BLOW, J. DNA replication, Many strands converge. *Nature* 326:441-442, 1987.
- BRAVO, R. FRANK, R., BLUNDELL, P.A., et al. Cyclin/PCNA is the auxilliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 326:515-517, 1987.
- BRAVO, R. & CELIS, J.E. A search for differential polypeptide synthesis throught of cell cycle of HeLa cells. *J. Cell Biology* 84:795-802, 1980.
- BROWN, O.C., GATTER, K.C. Monoclonal antibody ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17:489-503, 1990.
- BYNES, J.J., DOWONEY, K.M., BLACK, V.L., et al. Biochemistry 23:12316, 1984. Aput Blow, J. DNA replication Many strands converge. *Nature* 326:441-42, 1987.
- DIRICK, L., NASMITH, K. Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature* 351:754-757, 1991.
- DRAETTA, G., LUCA, F., WESTENDORF, J., et al. D. cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolitic inactivation of MPF. *Cell* 56:829-839, 1989.
- DREATTA, G., BEACH, O. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cell: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 54:17-26, 1989.
- DUNPHY, W.G., BRIZUELA, L., BEACH, D., et al. The xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54:423-431, 1988.
- FELIX, A.M., LEBBÉ, J.C., DORÉE, M. et al. Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature* 346:379-382, 1990.
- FIDOVICH-KED, J., HANSON, L.J., KEYOMARSI, K., etl al. Through the cell cycle: an overview. *Am. Rev. Resp. Dis.* 142:53-56, 1990.
- GARCIA, R.L., COLTRERA, M.D., GOWN, A.M., Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/ciclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with cytometric analysis. *Am. J. Pathol.* 134:733-739, 1989.
- GERDES, J., LI, L., SCHLVELTER, C., DUCHROW, M., et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody ki-67. *Am. J. Pathol.* 138: 867-873, 1991.
- HARWELL, L.H. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* 38:164-168, 1974.
- HARTWELL, L.H., WEINERT, T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634, 1989.
- HUBERMANN, J.A. Cell cycle control of initiation of eukaryotic DNA replication. *Chromossoma* 100:419-423, 1992.
- HUNT, T. Cell cycle gets more cyclins. *Nature* 350:462-463, 1991.
- KAMEL, O.W., LeBRUM, D.P., DAVIS, R.G., et al. Grown fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin 19A²: Correlation with ki-67. *Am. J. Pathol.* 138:1471-1477, 1992.
- KENNY, M.L., LEE, S.H., HURWITZ, J. Multiple functions of human single-strand-DNA binding protein in Simian virus 40.
- LASKEY, R.A., FAIRMAN, M.P. BLOW, J.J. S phase of cell cycle. *Science* 246:609-613, 1989.
- LEE, S.H., HURWITZ, L. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nbuclear antigen and activator. 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5672-5676, 1990.
- LEE, M.Y.; ALEJANDRO, R.; TOOMEY, N.L. - Immunochemical studies of DNA polymerase delta: relation with DNA polymerase alpha. *Arch. Biochem. Biophys* 272:1-9, 1989.
- LEWIN, B. - Perpetuation of DNA. In: Genes II. 2^a ed. Toronto, John Wiley & Sons, 1985. p. 533.
- LIU, Y.C.; MARRACCINO, R.L.; KENG, P.C.; et al. - Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry*, 28:2967-2974, 1985.
- MASUI, Y.; MARKET, C. - Cytoplasmic control nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177:129-146, 1971.
- MIYACHI, K.; FRITZLER, M.J.; TAN, E.M. - Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol*, 121: 2228-2234.
- MORENO, S.; NURSE, P.L.; RUSSEL, P. - Regulation of mitosis by cyclic acumulation of p80^{cdc25} mitotic inducer in fission yeast. *Nature* 344:549-552, 1990.
- MOTOKURA, T. BLOOMM, T.; KIM, H.G.; et al. - A novel cyclin encoded by a abl1-linked candidate oncogene. *Nature*, 350:512-515, 1991.
- MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. - Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 246: 614-621, 1989.
- MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. - What controls the cell cycle. *Scientific Am.* 264:34-41, 1991.
- NORTH, G. - Starting and stopping. *Nature* 351:604-605, 1991.
- NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503-508, 1990
- PARDEC, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 244:603-608, 1989.
- PINES, J.; HUNTER, T. - Human cyclins A and B1 are differentially located in cell undergo cell cycle-dependent nuclear transpot. *J. Cell Biol.*, 115:1-17, 1991.
- PRELICH, G.; KOSTURA, M.; MARSHAK, D.R.; et al. - The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 326: 471-475, 1987.
- PRELICH, G.; TAN, C.K.; KOSTURA, M.; et al. - Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxilliary protein. *Nature* 326:517-520, 1987.

39. SINGER, M.; BERG, P. - DNA replication. In: *Genes & Genomes*. Mill Valley, University Science Books, 1991. p. 73-128.
40. SMITH, L.; CKER, R. - The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 233-247, 1971.
41. SUGAWARA, I.; UCHINO, K.; MOROSHITA, Y.; et al. - Intracellular localization of a subunit of human DNA polymerase alpha affecting primase activity recognised by monoclonal antibody (HDR-859-E4) and its application to distinction between proliferative and non-proliferative lesion. *Br. J. Cancer* 60:176-181, 1989.
42. SUZUKA, I.; DAIDOGI, H.; MATSUOKA, M.; et al. Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3189-93, 1989.
43. TSURIMOTO, T.; STILLMAN, B. - Multiple replication factors augment DNA synthesis by the two eukaryotic DNA polymerase, alpha and delta. *EMBO J* 8:3883-3889, 1989.
44. TSURIMOTO, T.; MELANDY, T.; STILLMAN, B. - Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at SV40 DNA replication origin. *Nature* 346:534-539, 1990.