

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Disciplina de Genética Humana

Curso de Medicina

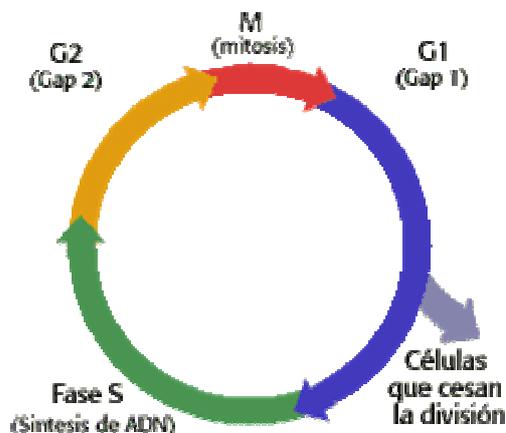
Estudo Dirigido: Ciclo Celular

1. Qual o papel de G₀ no ciclo celular? Células ativas em divisão possuem no seu ciclo uma fase G₀?
2. Como agem os pontos de checagem quando há dano ao material genético? Quais as fases que mais necessitam desses mecanismos?
3. Qual a relação entre os pontos de checagem e o câncer?
4. Quais os mecanismos reguladores das CDKs? Quais as diferentes formas de controle negativo do ciclo celular?
5. De que forma e quando agem os fatores de crescimento no ciclo celular? Como pode ser entendido o ponto de restrição?
6. Qual o papel da pRb na regulação do ciclo celular?
7. Por que a proteína p53 é essencial para o funcionamento adequado do ciclo celular? Existe relação com o câncer? Explique.
8. Explique a importância dos fatores licenciadores e dos pontos de metilação na replicação do DNA.
9. Quais os processos intracelulares promovidos pela ativação dos complexos CDK2-ciclina A e CDK2-ciclina B após a entrada da célula na fase S?
10. Que proteínas são capazes de inativar o complexo APC/Cdc20 quando há falha na ligação dos microtúbulos durante a metáfase? O que aconteceria se essas proteínas falhassem?

CICLO CELULAR – ESTUDO DIRIGIDO

O ciclo celular compreende uma seqüência complexa de eventos que garantem a transmissão correta, para as células filhas, de uma cópia completa do genoma. É um processo que atinge todas as células somáticas e engloba uma série de passos coordenados ao longo do ciclo que procuram assegurar o correto crescimento e desenvolvimento do organismo. Nesses passos, proteínas-chave associam-se e formam complexos ativos que conduzem o processo de duplicação e separação dos cromossomos. Essa regulação permite à célula ser encaminhada à progressão no ciclo, crescimento e multiplicação, à diferenciação celular, ou a uma condição de latência. Ocorrendo falhas nesses mecanismos regulatórios, a célula pode ser direcionada à apoptose ou ocasionar o desenvolvimento tumoral.

RELEMBRANDO AS FASES DO CICLO



O ciclo celular é composto por 4 fases: G1, S, G2 e a MITOSE propriamente dita. Durante o ciclo, fases de sínteses de DNA (S) são separadas por fases (*gaps*) nas quais ocorre síntese de RNA e proteínas, sendo que juntas essas três fases compõem a *intérfase* – período no qual não ocorre divisão celular. Em **G1**, que corresponde ao intervalo (*gap*) entre a mitose e a duplicação do DNA, a célula sintetiza proteínas necessárias para a fase seguinte e a massa celular aumenta para suportar a divisão celular. A **fase S** é o estágio de síntese do DNA. Durante esse estágio, cada cromossomo, que em G1 era uma única molécula de DNA, replica-se para se tornar um cromossomo bipartido, que consiste em duas cromátides-irmãs, cada uma contendo uma cópia idêntica da molécula original linear de DNA. Em **G2**, a célula sintetiza proteínas importantes para a organização de sua cromatina e para a mitose, na qual ocorre a divisão do material genético. A **mitose** constitui-se em um elaborado processo para garantir que cada uma das células-filhas receba um conjunto completo de informação genética. Esse resultado é obtido através de um mecanismo

- a segregação cromossômica - que é responsável por distribuir uma cromátide, de cada cromossomo, para cada célula filha.

O ciclo ao todo leva de 18 a 24 horas, sendo a mitose, a fase mais rápida; G1, é a mais lenta (de 10 a 12 horas); S tem uma duração de 6 a 8 horas e G2 de 2 a 4 horas. Há variações na duração do ciclo de acordo com o tipo de célula, podendo ser bem mais rápido (algumas poucas horas) em células lábeis, até meses em outros tipos de células. Neurônios e hemácias não se dividem, pois são totalmente diferenciados, ficando permanentemente em uma etapa do ciclo conhecida como G0. **G0** é um estado quiescente no qual as células adultas maduras podem ficar por tempo indeterminado. Nesse estágio, as células permanecem metabolicamente ativas, mas não se dividem ou, então, se dividem apenas quando estimuladas por sinais extracelulares, com a finalidade de renovação tecidual após morte ou lesão celular (como observa-se nos hepatócitos, que podem entrar em G0, mas após dano ao órgão, eventualmente voltam a G1 e continuam o ciclo celular).

A REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

O processo de regulação do ciclo celular é efetuado, basicamente, pela ação de **proteínas-chave** que controlam a seqüência específica de eventos que caracterizam o ciclo. Essas proteínas formam uma rede intra e extracelular complexa, que coordena não apenas a proliferação, mas também a quiescência, a diferenciação e a morte celular. Essas proteínas são reguladas, por sua vez, através de processos como fosforilação, desfosforilação, síntese e degradação. Além disso, existem **pontos de checagem** (ou *checkpoints*) que funcionam como pontos de controle de qualidade: caso haja dano ao material genético, ativa-se uma cascata de sinais para bloquear a progressão do ciclo naquela célula, colocando em funcionamento a maquinaria de reparo do material genético e/ou acionando a apoptose por meio de sensores, sinalizadores e efetores específicos. Esses pontos também são responsáveis por permitir a finalização correta dos passos de uma fase precedente, regulando a transição para a fase seguinte. A maior quantidade de pontos de checagem ocorre em células que estão em constante proliferação, porque, nesses casos, o risco de propagação de uma mutação deletéria é maior. Alterações nesses pontos de checagem levam ao acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas que, por sua vez, aumentam a probabilidade de malformações e o desenvolvimento de doenças como o câncer.

A progressão ordenada do ciclo celular depende de **fatores positivos**, que estimulam a continuidade do ciclo, e **fatores negativos**, capazes de parar o ciclo em um determinado estágio.

1. Controladores Positivos do Ciclo Celular:

A) A progressão do ciclo depende de uma classe especial de enzimas do tipo quinase de serina/treonina, cuja subunidade catalítica é conhecida como **CDK** (*cyclin-dependent kinase*). São expressas durante todo o ciclo (constitucionais), mas na forma inativa. Só são ativadas quando ocorre a ligação entre elas e subunidades regulatórias chamadas ciclinas.

B) A ciclina tem um padrão cíclico de acúmulo e degeneração, levando a uma variação periódica da sua concentração durante o ciclo. São sintetizadas somente

em fases específicas, conforme a exigência (facultativas) e, portanto, destruídas após a sua utilização. Liga-se às CDKs para que possam exercer suas funções.

As CDKs e as ciclinas ativadas levam à progressão do ciclo celular, sendo os principais fatores positivos para a evolução do ciclo. A ativação das CDKs-ciclinas depende da fosforilação desse complexo; já a inativação do complexo pode se dar pela degradação de ciclina, adição ou remoção de fosfato, e pela ligação de CKIs (ver abaixo). A inter-relação entre ativação e desativação da atividade de CDKs em várias etapas do ciclo é a chave para a progressão normal e para a regulação do ciclo celular, uma vez que cada fase oferece um ou mais pontos de controle específicos. A principal função do complexo CDK-ciclina é a fosforilação de várias outras proteínas em determinados estágios do ciclo.

2. Controladores Negativos do Ciclo Celular

- A) **CKIs (*cyclin kinase inhibitors*)**. Atuam sobre uma variedade de complexos CDK-ciclinas controlando a atividade desses complexos. O mecanismo pelo qual as CKIs atuam é dependente de sua concentração e não está completamente entendido. Tem como principal função bloquear a fosforilação de proteínas pela quinase e parar o ciclo celular. Existem duas classes de CKIs:
- Família CIP/KIP (proteína inibidora de quinase): incluem as proteínas com um domínio N terminal inibidor, sendo as proteínas **p21**, **p27** e **p57**. São inespecíficas (CKIs universais). Atuam evitando a ativação da quinase.
 - Família INK4 (inibidor de CDK): tem ação seletiva sobre o complexo ciclina D/CDK 4,6, sendo as proteínas **p15**, **p16**, **p18** e **p19**. Ligam-se sobre a quinase protéica, evitando a sua interação com a ciclina D, inibindo assim a ativação da quinase.
- B) **Sistema ubiquitina de degradação de proteína**: atua na degradação das ciclinas, permitindo a transição de fases do ciclo. Normalmente, promove a proteólise por meio da adição de cadeias de ubiquitina às moléculas de ciclina, que são então degradadas pelo proteossomo. Eventos mutacionais provocam a perda do sinal para degradação, levando à estabilização e expressão contínua das ciclinas.
- C) **Fosfatases Específicas**: Fazem a remoção do fosfato essencial para a ativação do complexo CDK-ciclina ou a adição de mais um fosfato também bloqueando a atividade da quinase.

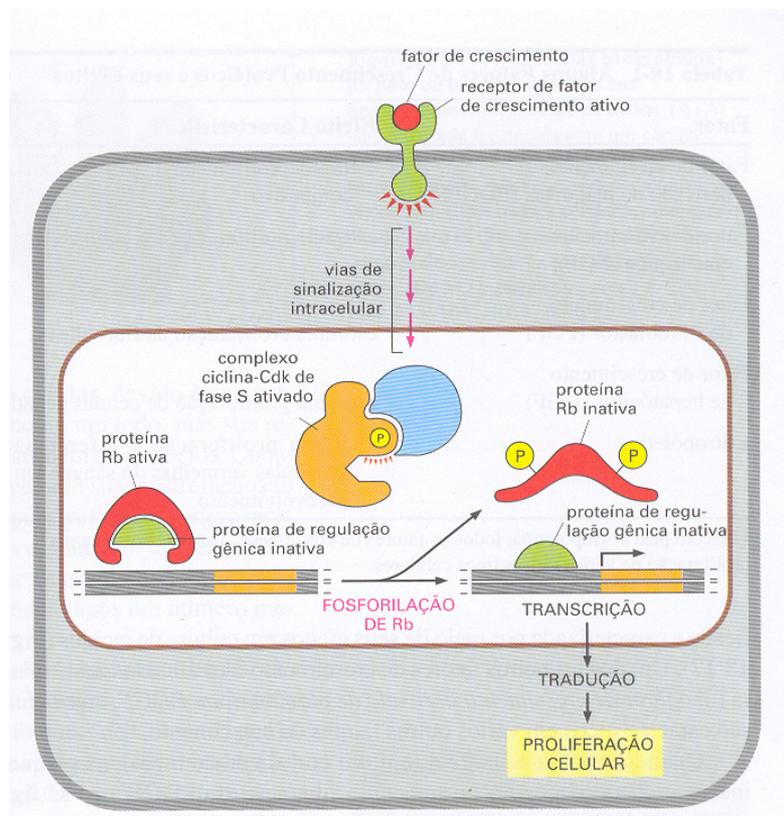
Para que o ciclo celular seja iniciado, deve ocorrer o estímulo mitogênico adequado, que ocorre a partir da ligação de um fator de crescimento a um receptor específico na membrana plasmática, no citoplasma ou no núcleo. Esta ligação inicial desencadeia uma cascata de ativação de proteínas transdutoras de sinal, que enviam o sinal mitogênico até o núcleo, sendo genes-alvo aqueles codificadores das ciclinas e CDKs e genes essenciais para a síntese de desoxirribonucleotídeos e DNA. Na ausência de fatores mitogênicos, as células são incapazes de ultrapassar o **ponto de restrição** em G1 e tornam-se quiescentes. O ponto de restrição pode ser considerado como um ponto crítico dentro do ciclo celular que precisa ser ultrapassado para que o ciclo ocorra de fato; uma vez ultrapassado, a célula torna-se comprometida a entrar na fase S. Qualquer mutação nos genes que codificam as proteínas dessa cascata pode resultar em alterações do ciclo e no desenvolvimento de algumas neoplasias humanas. Dentre os principais fatores de crescimento celular estão os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento epidérmico (EGF),

fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e insulina.

FASE G1

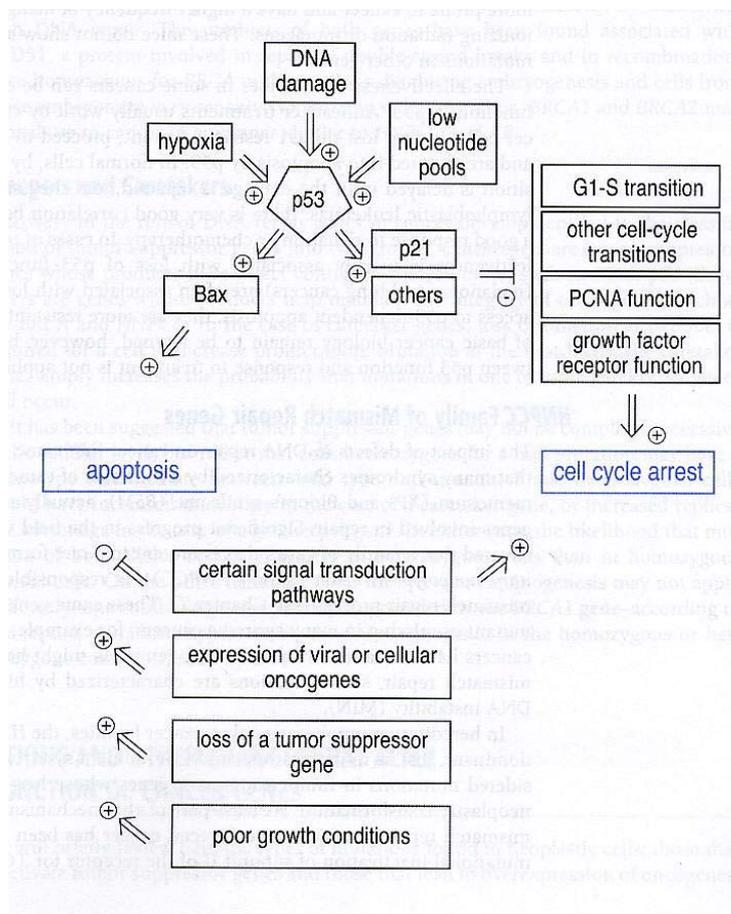
Após o estímulo de fatores mitogênicos, ocorre elevação dos níveis de ciclina D com formação do complexo envolvendo as quinases CDK4 e CDK6.

A **proteína pRb** (proteína do retinoblastoma) controla negativamente o ciclo nesta etapa. Ela ocorre em uma forma desfosforilada durante os dois primeiros terços da fase G1, antes que o ponto de restrição seja atingido. Enquanto pRb permanecer desfosforilada, ela restringe o crescimento celular bloqueando a progressão da célula e evitando que ela ultrapasse o ponto de restrição da fase G1 para a fase S. No início do ciclo, a pRb está ligada a um fator, o E2F, o que permite que ela não seja fosforilada, evitando assim a continuação do ciclo. Conforme o ciclo avança e a célula progride rumo à transição G1/S, a pRb é fosforilada pela CDK4 e 6, liberando o fator E2F. O E2F atua como fator de transcrição, estimulando a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, entre eles o da ciclina E, além de genes requeridos para a síntese de nucleotídeos e de DNA polimerase. Além disso, estimula o próprio E2F, em um sistema de retroalimentação positiva. A pRb é mantida fosforilada nas fases S, G2 e durante a mitose. Apenas após a mitose, quando os níveis de CDK-ciclina ficam muito reduzidos, ela volta ao seu estado ativo desfosforilada.



A **proteína p53** é parte dos mecanismos de *checkpoint* da célula. Quando ocorrem mutações no DNA, ela interage com o ciclo celular na tentativa de identificar eventuais erros e permitir que estes sejam reparados. É um fator de transcrição que

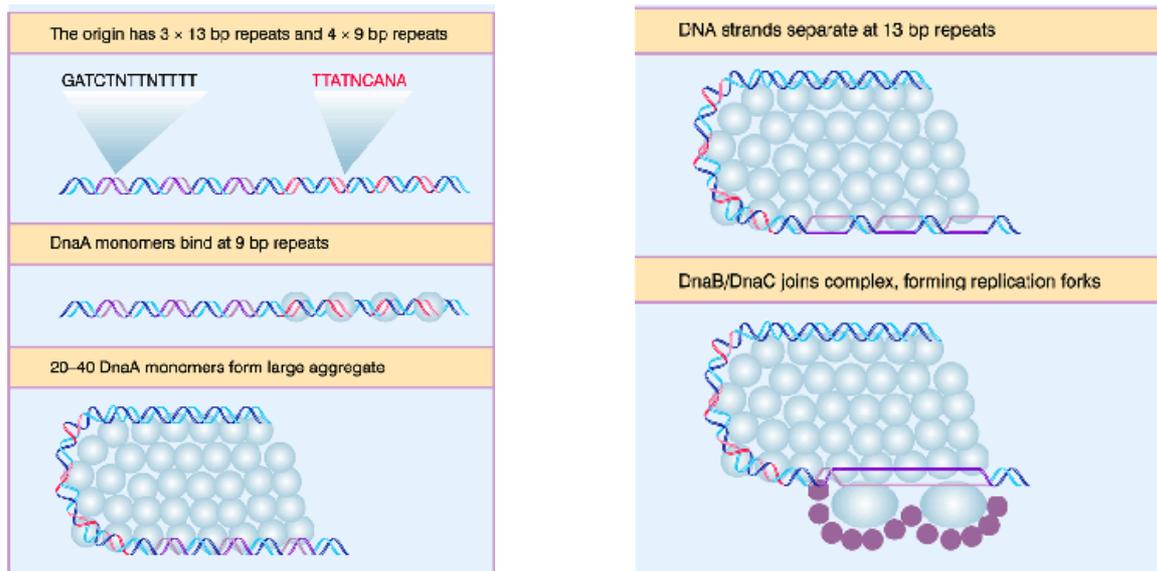
bloqueia o ciclo celular e impede a progressão para a fase S ou promove a morte celular. Entre seus efetores está a **p21**, capaz de inibir as CDKs responsáveis pela entrada na fase S. A produção aumentada de p21 vai bloquear a atividade de quinase do complexo ciclina/Cdk; este, por sua vez, não vai fosforilar pRb, que não vai liberar o fator E2F e o ciclo vai parar. Esta interrupção no ciclo tem por finalidade permitir que o dano no DNA seja corrigido para que a célula continue sua divisão, ou então que a célula seja encaminhada à apoptose, caso o dano seja deletério e não sujeito a correções. Um outro controlador que atua ao término de G1 é a CKI **p27**, que vai bloquear a atividade de quinase do complexo ciclinaE/Cdk2, causando também uma parada no ciclo celular.



FASE S

A entrada na fase S, vindo de G1, e a progressão de S para G2 dependem também do funcionamento dos complexos CDK-ciclina. Em G1 tardio, enquanto a expressão da ciclina E aumenta, estimulada pelo fator de transcrição E2F, os níveis de ciclina D são reduzidos por causa da diminuição da oferta de fatores de crescimento. Conseqüentemente, é reduzida a concentração dos complexos CDK4,6-ciclina D e aumentam os níveis de CDK2-ciclina E, cuja ativação promove a entrada da célula na fase S. Os mecanismos exatos envolvidos nesta etapa, entretanto, não são ainda compreendidos.

Na transição G1/S, a ciclina A começa a ser sintetizada, e os complexos CDK2-ciclina A mostram importante função imediatamente antes da síntese de DNA, fosforilando proteínas específicas envolvidas com as origens de replicação do DNA. As origens de replicação são regiões na fita de DNA que possuem características incomuns, como seqüências consenso de nucleotídeos repetidos, que são reconhecidas por um complexo enzimático, iniciando o processo de replicação do DNA. Estas proteínas específicas são conhecidas como fatores licenciadores, os quais se ligam a determinados pontos da molécula de DNA, permitindo a deselicoidização da estrutura dupla-fita, a fim de que seja replicada. Os fatores licenciadores acumulam-se durante G1, atuam em S, e são destruídos em G2 para impedir nova replicação antes da mitose. Como são várias as origens de replicação (ou seja, a duplicação do material genético ocorre em vários locais simultaneamente), são igualmente importantes nesta fase os pontos de metilação. Eles sinalizam que determinada seqüência da molécula já replicou, impedindo excesso de material duplicado. Um outro componente é o complexo mitótico CDK2-ciclina B ou Fator Promotor da Mitose (MPF). Ele permanece inativo durante toda a fase S e protege a célula de uma divisão antes que ela esteja totalmente pronta para isto. É importante salientar ainda a existência de um ponto de checagem na fase S, o qual também é induzido por danos no DNA, e envolve proteínas que regulam a atividade das CDKs, fatores de transcrição e proteínas de reparo.



FASE G2

Nesta fase, inicia-se a condensação da cromatina e a formação de estruturas bem definidas para que a célula possa progredir para a mitose. A principal quinase desta fase é a CDK1, que forma complexos tanto com a ciclina B quanto com a ciclina A. A CDK1 ativa-se quando é fosforilada, depois que isto ocorre, ela fosforila importantes substratos que serão cruciais na mitose. Além disso, a CDK1 contribui para a regulação do complexo promotor de anáfase (APC).

Para a célula progredir para a mitose é necessária a súbita ativação do complexo CDK2-ciclina B (ou MPF) pela desfosforilação, que ocorre na transição G2/M e resulta na fosforilação de muitas proteínas necessárias à mitose. Esse complexo é

essencial para a entrada e a saída da fase M. Durante G2 e antes da entrada na fase M, CDK2 liga-se à ciclina B, formando um complexo que é fosforilado, permanecendo inativo. Quando esse complexo é, por fim, desfosforilado, ocorre sua ativação, e a mitose começa.

Dois pontos de checagem ocorrem um pouco antes ou durante a mitose. O primeiro deles ocorre em resposta a DNA não duplicado ou lesado, impedindo a ativação da CDK1 e bloqueando as células em G2/M. A p53 também atua nesse ponto de checagem inibindo o complexo CDK1-ciclina B. O segundo ponto de checagem envolve as proteínas das famílias BUB, MAD e Cdc20, impedindo o início da anáfase enquanto todos os cromossomos não mostrarem uma ligação correta ao fuso (*checkpoint* mitótico, ver quadro abaixo)

Relembrando o *checkpoint*

Quando não há ligação dos microtúbulos aos cinetócoros correspondentes ou quando não há tensão adequada na ligação, os cinetócoros produzem continuamente um sinal que ativa um mecanismo de *checkpoint*. A sinalização bioquímica culmina em interações moleculares entre MAD, BUB e o APC, atrasando a segregação cromossômica.

MAD e BUB inativam o APC através de ligação direta ao Cdc20. O complexo MAD2/BUB1/Cdc20 constitui o complexo de *checkpoint* mitótico e impede o funcionamento do APC, retardando o início da anáfase até que todos os cinetócoros estejam adequadamente ligados aos microtúbulos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do enorme conhecimento que tem sido gerado nos últimos anos acerca dos mecanismos que conduzem uma célula à duplicação e à segregação de seu material genético para as células-filhas, ainda há muitas questões a serem respondidas.

O câncer se caracteriza pela proliferação descontrolada a partir de mutações em genes que controlam o ciclo celular. Alterações afetando a função de elementos reguladores como p16 (melanomas, linfomas, câncer de pulmão, pâncreas, etc), ciclina D (câncer de mama, de próstata, estômago, etc.), p53 (mama, ossos, colo, etc.) e pRB (principalmente o retinoblastoma, além de sarcoma e outros) são apenas alguns dos exemplos conhecidos da inter-relação entre câncer e regulação do ciclo celular.

Monitores: Ângela Schutz Paschoal

Diego Alex Oss