

# CHECKPOINT (Ponto de Checagem)

## O que é?

Durante o ciclo celular a célula passa por uma série de eventos seqüenciais, onde um passo tem de ser completado antes que o próximo seja iniciado. Essa progressão linear é alcançada de duas maneiras: cada etapa requer um produto da etapa anterior para seu início ou há um mecanismo regulatório de feedback, que assegura que a etapa subsequente do ciclo celular não seja iniciada antes que um evento crucial tenha sido completado corretamente.

As células eucarióticas desenvolveram mecanismos de controle de qualidade, coletivamente chamados de **checkpoints**, que asseguram a correta execução dos eventos do ciclo celular, garantindo, dessa forma, a estabilidade genética. O checkpoint é um mecanismo de feedback que monitora a execução do ciclo celular e inibe o início de eventos subsequentes até que os processos da etapa anterior sejam executados com sucesso.

## Tipos de checkpoint:

- } **checkpoint de dano do DNA:** apto a bloquear o ciclo celular nas fases G1, S, G2 e mitose;
- } **checkpoint de replicação do DNA:** monitora a progressão através da fase S;
- } **checkpoint do fuso mitótico** ("mitotic spindle checkpoint"): monitora a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (descrito pela primeira vez em 1991).

## Estrutura

Em geral, todos os checkpoints apresentam uma **estrutura comum** composta de três componentes essenciais:

- } um **sensor**, que monitora o processo;
- } um **transdutor**, que sinaliza quando um processo não se completa adequadamente;
- } um **alvo**, que responde ao sinal, inibindo eventos subsequentes.

## Checkpoint do Fuso Mitótico

O checkpoint do fuso mitótico monitora a **ligação dos cromossomos aos microtúbulos** do fuso mitótico durante a metáfase e está apto a impedir a progressão desse processo, a fim de que possa garantir a **segregação idêntica** do material genético entre as células-filhas e preservar a **integridade do genoma** em nível cromossômico.

No início da divisão celular, uma proteína especializada, denominada **cinetócoro**, localizada em cada cromátide na região centromérica, captura os microtúbulos que vêm de cada um dos pólos opostos da célula.

A duplicação do material genético e a separação em duas células-filhas são eventos críticos na divisão celular. Para a manutenção da integridade do genoma, todas as cromátides-irmãs têm que estar ligadas, através de seus cinetócoros, a microtúbulos do fuso oriundos de pólos opostos da célula. A separação concomitante das cromátides permite a herança de um conjunto idêntico de cromossomos para cada célula-filha.

Se a célula inicia a anáfase e começa a segregação cromossômica sem que todos os pares de homólogos tenham estabelecido conexões com ambos os pólos do fuso, algumas células irão herdar duas cópias de um cromossomo, enquanto outras, nenhuma.

Um único cinetócoro que não esteja ligado adequadamente ao microtúbulo correspondente gera um sinal inibitório, que atrasa a progressão da mitose, até que haja ligação correta. Também, se o microtúbulo ligado ao cinetócoro não estiver exercendo tensão adequada neste, é ativado o mecanismo de controle.

**IMPORTANTE!** O cinetócoro, antes visto apenas como o local de ligação dos microtúbulos, agora é considerado fundamental, pois é a principal estrutura que sinaliza para a ativação do checkpoint!

É através desse mecanismo de vigilância que atua o **checkpoint mitótico**. Para que a célula entre na anáfase, duas condições devem ser satisfeitas:

(1) o conjunto completo de microtúbulos deve estar ligado aos cinetócoros, garantindo a captura de todos os cromossomos pelo fuso;

(2) deve haver ligação adequada com os cinetócoros das cromátides-irmãs, garantindo que o cromossomo esteja alinhado na placa metafisária.

### Principais Famílias de Proteínas

Diversas moléculas têm sido descritas como componentes do checkpoint. As primeiras análises genéticas foram feitas em fungos (*Saccharomyces cerevisiae*) e posteriormente foram descobertos genes homólogos no genoma humano.

Há duas principais famílias de proteínas envolvidas nesse mecanismo:

- } **Família MAD** (“mitotic arrest deficient”), composta por MAD1, 2 e 3, destacando-se entre elas a **MAD2**, uma pequena proteína composta por 205 aminoácidos, codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossomo 4q27. A MAD2 é encontrada, em grandes quantidades, associada aos cinetócoros não-ligados aos microtúbulos durante a metáfase. A interação entre a MAD2 e outros componentes adicionais do checkpoint com os cinetócoros não-ligados permite o bloqueio do início da anáfase, prevenindo a segregação cromossômica desigual.
- } **Família BUB** (“budding uninhibited by benzimidazole”), composta por BUB1, 2 e 3, devendo-se dar atenção especial para **BUB1**, uma proteína com atividade GTP-ase, codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossomo 2q12-14. A BUB1 interage diretamente com a MAD2, na sinalização para o atraso da anáfase.

### Segregação Cromossômica Normal

Para entendermos como se dá em nível molecular a regulação da mitose pelo checkpoint, precisamos saber como é o controle molecular de uma mitose normal.

A permissão para o início da mitose é dada pelos checkpoints do DNA da fase G2 do ciclo celular. Essa permissão é traduzida bioquimicamente pela ativação do complexo MPF (“mitosis promoting factor”). A mitose inicia pela ativação da Cdk1 através da sua fosforilação pelas ciclinas mitóticas, como a Cdc25.

O complexo Cdk1 ativado fosforila inúmeros substratos responsáveis por desencadear eventos celulares característicos da mitose: quebra da membrana nuclear, separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico, condensação dos cromossomos e fragmentação do complexo de Golgi.

No final da metáfase, há ativação do complexo APC (“anaphase promoting complex”), um dos principais elementos ubiquitina-dependente da maquinaria proteolítica celular, através da sua ligação com proteínas Cdc20. O complexo APC controla a separação dos homólogos e sua migração para pólos opostos da célula através da degradação dos inibidores do início da anáfase (securinas e ciclinas), proteínas que mantêm as cromátides-irmãs unidas.

Com a destruição das ciclinas mitóticas pelo APC, o Cdk1 é inativado, sinalizando para a citocinese e finalização da mitose. O Cdk1 inativado também permite a reformulação de complexos necessários para um novo ciclo de replicação do DNA (novo ciclo celular).

Para que a célula entre em anáfase, duas condições devem ser satisfeitas:

- O conjunto completo de microtúbulos deve estar ligado aos cinetócoros, garantindo a captura de todos os cromossomos pelo fuso;
- A ligação dos microtúbulos aos cinetócoros deve ser adequada, garantindo que o cromossomo esteja alinhado na placa metafisária.

### Como Funciona 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 o 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 que é formado constitui o MCC (“Mitotic Checkpoint Complex”) e impede o funcionamento do APC, retardando o início da anáfase até que todos os cinetócoros estejam adequadamente ligados aos microtúbulos.

Proteínas responsáveis pela manutenção das cromátides-irmãs unidas:

- Coesina – une as cromátides-irmãs.
- Separase – lisa subunidades de coesina.

- Securina – associada à separase, inativando-a.

Checkpoint off (anáfase normal): APC/Cdc20 ubiquitina a securina, inativando-a e permitindo que a coesina seja clivada pela separase, com liberação das cromátides-irmãs e progressão da anáfase.

Checkpoint on: A ausência do complexo APC/Cdc20 impede a ligação da ubiquitina com a securina. Assim, a separase permanece inativa e há atraso na separação das cromátides-irmãs.

Quando há ligação do último cinetócoro aos microtúbulos, cessa a sinalização bioquímica e também a produção de MCC, permitindo ao Cdc20 se dissociar de MAD2 e BUB1 e se ligar ao APC. O resultado final desse processo é a ativação do APC com conseqüente degradação das securinas, dando continuação ao ciclo celular  $\diamond$  entrada em anáfase.

### Erros no Checkpoint:

Se a célula inicia a anáfase e começa a segregação cromossômica sem que todas as cromátides-irmãs tenham estabelecido conexões com ambos os pólos do fuso, algumas células irão herdar duas cópias de um cromossomo, enquanto outras, nenhuma.

Isso ocorre devido a erros no ponto de checagem do fuso, por mutações em genes que codificam elementos que participam desse processo (ex: Mad2, Bub1), produzindo elevadas taxas de eventos de segregação cromossômica desigual. As mutações que comprometem o ponto de checagem do fuso durante o processo mitótico contribuem para a instabilidade cromossômica, gerando anomalias cariotípicas. Rearranjos cromossômicos e aneuploidias são marcadores de células tumorais, sugerindo que a **falha no ponto de checagem do fuso** é um passo fundamental na conversão de uma célula normal em um câncer.

Além disso, perdas momentâneas de função do checkpoint em mitoses pós-zigóticas podem produzir mosaicismos cromossômicos para determinada trissomia (ex: Síndrome de Down).

### Durante a mitose:

- perdas momentâneas da função da MAD2 em mitoses pós-zigóticas podem levar a mosaicismos cromossômicos para determinada trissomia (ex: S. Down).
- perdas definitivas da função da MAD2 em mitoses somáticas podem desencadear processo neoplásico.

Durante a meiose: A inativação do ponto de checagem durante o processo meiótico implica na formação de gametas portadores de aneuploidias cromossômicas. Esses gametas alterados poderão dar origem a crianças portadoras de síndromes cromossômicas (ex: 47, XX +21) ou ser uma das possíveis causas de abortos espontâneos, pois o zigoto formado é incompatível com a vida (47, XX+16).

Estudos sobre a função do checkpoint durante a meiose mostraram que a inativação do ponto de checagem por uma mutação na Mad2, por exemplo, leva a um grande aumento na taxa de segregação cromossômica desigual durante a meiose I, mas parece não aumentar significativamente a taxa de erro para a meiose II.

Uma possível explicação para o fato da ausência do ponto de checagem do fuso íntegro **comprometer a meiose I diferentemente da meiose II** é que os cromossomos são mantidos unidos de maneiras diferentes nos dois processos.

Na meiose II, as cromátides-irmãs estão conectadas diretamente umas as outras pelos seus centrômeros, o que pode evitar que ambos os cinetócoros se liguem a microtúbulos provenientes do mesmo pólo do fuso. Na meiose I, devido aos locais de recombinação, o par de homólogos é mantido unido pelos quiasmas ao longo de seus braços, em locais específicos. Quanto maior o cromossomo, maior a distância entre o centrômero e o local de recombinação, criando uma ligação mais flexível entre os cinetócoros dos dois homólogos. Essa flexibilidade pode fazer com que os cinetócoros dos dois homólogos se tornem funcionalmente mais independentes, aumentando, assim, a incidência de eventos onde ambos os pares de cromátides se liguem a microtúbulos provenientes do mesmo pólo do fuso.

### Conseqüências Clínicas:

As alterações no ponto de checagem do fuso estão relacionadas:

- ao início do **processo neoplásico**: altos níveis de instabilidade cromossômica relacionados a alterações no mecanismo do checkpoint mitótico foram encontrados em diversos tipos de

células tumorais, entre elas, adenocarcinoma e carcinoma de pequenas células de pulmão, adenocarcinoma colorretal, hepatocarcinoma e carcinoma ductal invasor de mama.  
- formação de zigotos com **conjunto cromossômico alterado**, levando a abortos espontâneos ou nascimento de crianças sindrômicas.

### Catástrofe Mitótica:

Processo de morte celular que ocorre durante a mitose como resultado da ineficiente ativação dos checkpoints, particularmente, do checkpoint de dano do DNA e do checkpoint do fuso mitótico.

A célula que falha em executar esse programa apoptótico, em resposta a algum erro durante a mitose, vai originar células-filhas aneuplóides, favorecendo a instabilidade cromossômica.

A catástrofe mitótica pode, então, ser concebida como um mecanismo que previne a aneuploidização, processo que pode participar da oncogênese.

