

TEXTO 3

MUTAÇÃO E REPARO DO DNA

Mutação

Introdução

Erros de incorporação de Nucleotídeos na Replicação

Alterações Químicas de Nucleotídeos do DNA

- 1) Desaminação hidrolítica de bases
- 2) Perda de bases
- 3) Formação de dímeros de timina

A Origem das Mutações Induzidas: os Agentes Mutagênicos

Agentes mutagênicos químicos

Agentes mutagênicos físicos

Reparo do DNA

- 1) Reparo de erros de emparelhamento entre bases (*mismatch*)
- 2) Reparo direto
- 3) Reparo por excisão de bases
- 4) Reparo por excisão de nucleotídeos
- 5) Reparo recombinacional ou reparo de quebras de dupla-fita.

Sistemas de reparo induzíveis em bactérias

Exercícios

Parte A: Revendo Conceitos Básicos

Parte B: Ligando Conceitos e Fatos

Parte C: Aplicando Conceitos

Parte D: Resolvendo Problemas

Apresentação

Durante o processo de replicação do DNA ocorrem erros que, caso não sejam corrigidos pelas polimerases, se perpetuam na forma de mutações. Além disso, as moléculas de DNA estão continuamente sofrendo danos por ação de agentes físicos e químicos. Apesar de as células possuírem sofisticados mecanismos para reparar essas lesões, umas poucas deixam de ser corrigidas e se perpetuam na descendência. Essa baixa taxa de mutação é, no entanto, fundamental à evolução, pois é dessa forma que surgem novos alelos. Neste capítulo estudaremos os mecanismos que podem causar mutações no DNA e também os mecanismos utilizados pelas células para corrigir os erros de replicação e os danos causados por agentes diversos.

Essa apostila foi organizada pelos docentes do Instituto de Biociências da USP que ministraram e ministram as disciplinas “Biologia Molecular e de Microrganismos”, “Biologia Molecular” e “Fundamentos de Biologia Molecular” para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas. O texto foi adaptado e compilado de diversos livros didáticos e materiais instrucionais.

Mutação

Introdução

O DNA é, em última análise, um conjunto de instruções que comanda todo o funcionamento da célula. Em sua sequência de bases estão codificadas todas as instruções que permitem às células realizar suas funções e se reproduzir, perpetuando, dessa forma, os sistemas biológicos. Assim, alterações na sequência de bases do DNA devem ser evitadas, pois podem causar sérios distúrbios ao funcionamento celular ou mesmo matar a célula.

As moléculas de DNA, no entanto, sofrem danos constantemente, principalmente em consequência da ação de numerosos agentes genotóxicos. Para salvaguardar sua integridade genética, as células dispõem de complexos mecanismos que evitam alterações na sequência de bases do DNA. Esses mecanismos atuam substituindo nucleotídeos erroneamente incorporados durante a replicação do DNA ou nucleotídeos que sofreram alterações químicas no decorrer da vida da célula. De fato, o DNA é a macromolécula que está sujeita à ação do maior número de sistemas de reparo conhecidos. Isso obviamente tem um custo energético alto, o qual, no entanto, é muito pequeno, se considerarmos as consequências que podem advir da manutenção de uma sequência de bases alterada no DNA.

Neste capítulo tratamos dos mecanismos que podem alterar a sequência de bases do DNA, ou seja, que podem levar a mutações, e também dos mecanismos celulares que buscam evitar as alterações de sequência do DNA, os mecanismos de reparo.

Mutação pode ser definida como qualquer tipo de alteração na sequência nucleotídica do DNA. Ela pode ser uma simples substituição de um par de bases, pode ser a deleção ou inserção de uma ou algumas bases ou corresponder a alterações maiores na estrutura de um cromossomo, como alterações de número dos cromossomos e de estrutura de cromossomos (como, por exemplo, inversões e translocações de segmentos cromossômicos). A estas alterações de maior escala dá-se o nome de mutações cromossômicas.

As mutações são importantes porque podem gerar modificações nos genes, e as variações em um gene correspondem a novos alelos na população. As variações no material genético são o substrato da evolução adaptativa, pois estão sujeitas à seleção natural.

Nos organismos multicelulares as mutações podem acontecer tanto em células somáticas quanto em células germinativas. As mutações somáticas afetam apenas o indivíduo no qual elas ocorrem, não sendo transmitidas às gerações futuras, a não ser no caso de reprodução assexuada. Esse tipo de mutação tem chamado a atenção dos pesquisadores principalmente pelo fato de ser a causa da maioria dos tipos de câncer, doença responsável por cerca de 30% dos óbitos que acontecem nos países desenvolvidos. Já as mutações que acontecem nas células germinativas podem ser transmitidas às gerações futuras. No entanto, como as mutações são, em sua maioria, deletérias, elas tendem a ser eliminadas pela seleção natural, embora as raras mutações benéficas sejam favorecidas por esse mecanismo.

As mutações são classicamente divididas entre mutações induzidas ou espontâneas. As alterações produzidas por diversos agentes mutagênicos físicos e químicos são as chamadas de induzidas. Diz-se que são mutações espontâneas aquelas decorrentes de processos que ocorrem naturalmente nas células, que podem ser modificações químicas que ocorrem naturalmente nos nucleotídeos, mas também os erros de incorporação de nucleotídeos que ocorrem na replicação do DNA. No entanto, a distinção entre os dois tipos não é tão clara, pois pode-se também chamar de mutações espontâneas as causadas por agentes mutagênicos presentes no ambiente celular, provenientes do próprio metabolismo celular.

As mutações podem ocorrer por erros na incorporação de nucleotídeos durante a replicação do DNA ou por modificações químicas de nucleotídeos já incorporados na molécula. Tanto os erros de incorporação de nucleotídeo quanto a modificação química de um nucleotídeo presente no DNA podem causar uma alteração permanente na instrução genética caso o nucleotídeo não seja substituído antes que a molécula se replique. Essas alterações permanentes na sequência de bases do DNA são as mutações.

Erros de incorporação de Nucleotídeos na Replicação

A replicação é um processo extremamente eficiente. Somente 1 a cada 10^9 a 10^{10} nucleotídeos incorporados pela polimerase do DNA ocorre de maneira incorreta e não obedece ao emparelhamento proposto por Watson-Crick. Esta grande eficiência pode ser explicada por dois motivos:

- a. a subunidade catalítica da DNA polimerase é eficiente por si só e comete um erro a cada 10^4 ou 10^5 nucleotídeos adicionados;
- b. a atividade revisora “*proofreading*” da polimerase cliva os nucleotídeos erroneamente incorporados permitindo a adição de um correto.

Um erro de incorporação de nucleotídeo, por exemplo, a introdução de um nucleotídeo com adenina no lugar de um com guanina, gera uma falha de emparelhamento entre a base desse nucleotídeo e a de seu par na cadeia molde; no caso, teríamos C-A no lugar de C-G. Esse tipo de erro é, em geral, autocorrigido pela própria polimerase do DNA, a qual pode remover o último nucleotídeo incorporado se ele não estiver corretamente emparelhado à cadeia molde, introduzindo em seu lugar o nucleotídeo correto. Caso o erro não seja corrigido pela polimerase, outros sistemas de proteção do DNA podem detectá-lo e corrigi-lo. No entanto, no caso de um emparelhamento errado, os sistemas de correção podem não ser capazes de reconhecer qual dos dois nucleotídeos do par deve ser trocado. Nesse caso, em 50% dos casos seria trocado o nucleotídeo correto, originando uma mutação. (Fig. 1)

Mas, ocasionalmente, ocorre da molécula de DNA replicar-se antes da detecção e correção do erro. Neste caso, uma das moléculas-filhas ficará com o par de bases correto naquele ponto da molécula, em nosso exemplo, com o par C-G, enquanto a outra ficará com um par de bases diferente, ou seja, com o par T-A. Ambas as moléculas, apesar de diferirem em suas sequências de bases, são estruturalmente normais e, desse modo, o erro em uma delas não pode mais ser detectado e corrigido, perpetuando-se, assim, nas gerações futuras.

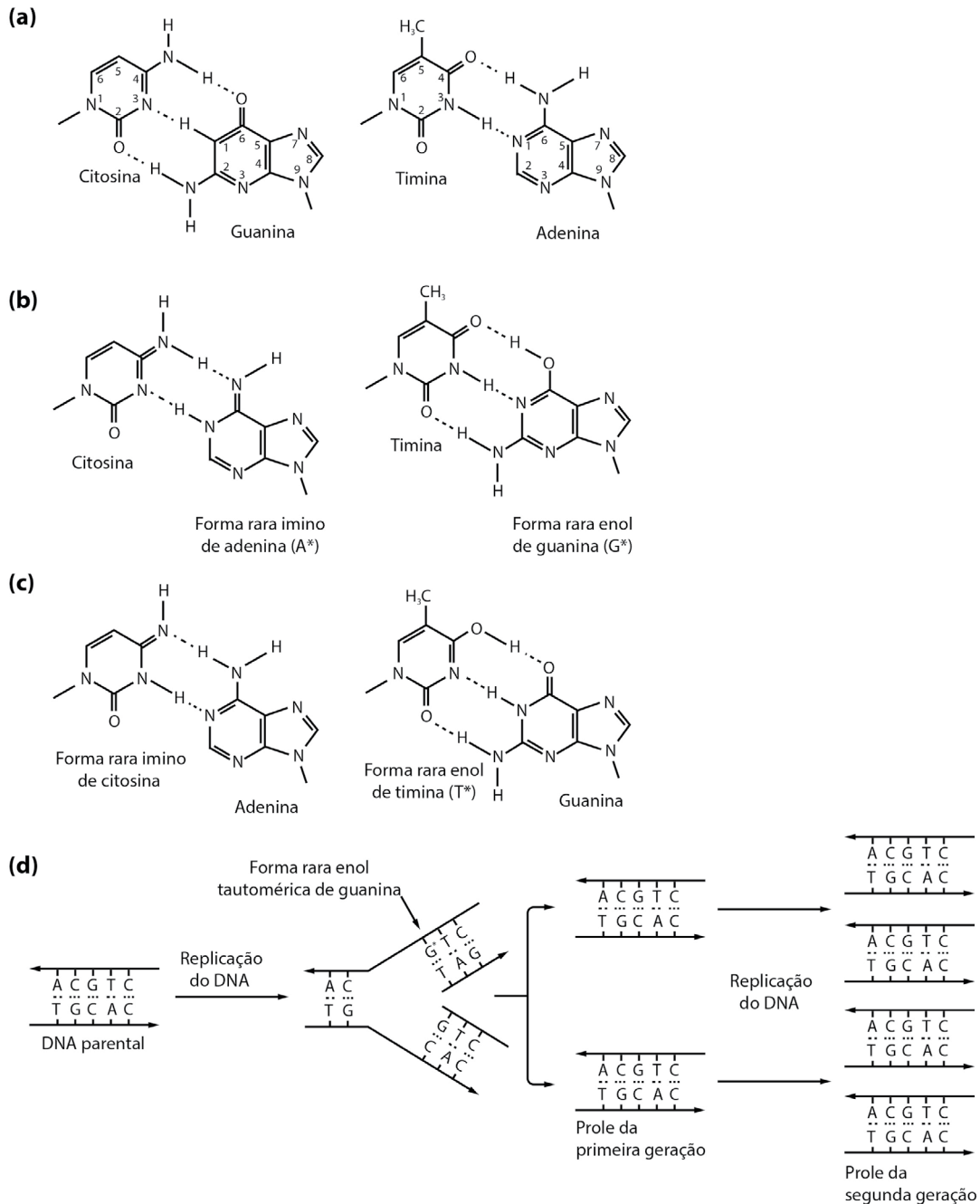


Figura 1. Emparelhamentos entre bases normais do DNA (A) e entre bases normais e tautômeros. (B e C). (D) Uma guanina sofre alteração tautomérica na época da replicação (a e b), emparelhando-se a uma timina. Na replicação seguinte (c e d), a timina incorporada errada orienta a incorporação de uma adenina, enquanto que a guanina, que voltou a sua forma cetônica, orienta a incorporação de uma citosina. O resultado é uma mutação em que um par de bases G-C é trocado por outro A-T.

Alterações Químicas de Nucleotídeos do DNA

As alterações químicas que os nucleotídeos sofrem, muitas vezes espontaneamente, são de três tipos principais: desaminação de bases, perda de bases e formação de dímeros de pirimidina.

1) Desaminação hidrolítica de bases

Desaminação hidrolítica é a perda de um grupo amino (-NH₂) que certas bases podem sofrer como resultado de reações de hidrólise. Esse tipo de alteração química em geral modifica as propriedades de emparelhamento da base. Por exemplo, a hipoxantina resultante da desaminação da adenina emparelha-se com a citosina ao invés de timina. Assim, a desaminação da adenina ocasiona a troca de um par de bases A-T por um par G-C.

O tipo mais frequente de desaminação do DNA é a da citosina. Ao perder um grupo amino, a citosina se transforma em uracila, fenômeno que ocorre na frequência de 100 transformações por genoma, por dia. Como

a uracila   capaz de se emparelhar com a adenina, a desamina o da citosina ocasiona a troca de um par de bases C-G por um par T-A. (Fig. 2)

Uma das explica es do porquê de o DNA possuir timina, e não uracila como o RNA,   a possibilidade de detec o e corre o dos erros decorrentes da desamina o hidrolítica da citosina, com elimina o de todas as uracilas do DNA, o que evita a eleva o da taxa de muta o a níveis insuportáveis para as espécies. Imagine se o DNA tivesse uracila e não timina. Uma desamina o de citosina originaria o par U-G que, por não se emparelhar corretamente, seria detectado como erro pelo sistema de salvaguarda do DNA. No entanto, não haveria como saber qual das bases era a correta e a corre o seria ao acaso, resultando em 50% dos casos na troca de um par C-G por um par U-A. Como a uracila não ocorre no DNA, sempre que aparecer um par U-G, o sistema de corre o sabe que a base a ser eliminada   a uracila e, desse modo, regenera em 100% dos casos o par C-G.

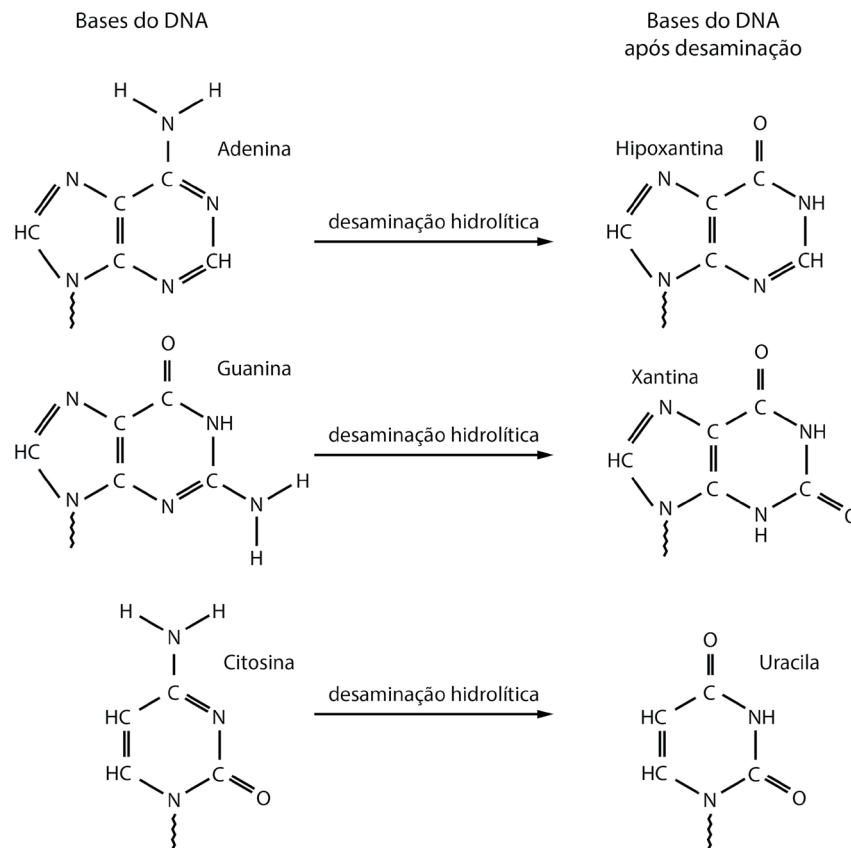


Figura 2. Rea o de desamina o de algumas bases nitrogenadas do DNA.

2) Perda de bases

Os nucleotídeos que constituem uma molécula de DNA podem sofrer quebras espontâneas em suas liga es N-glicosídicas, ou seja, nas liga es que unem a base nitrogenada ao a ugar, com conseqüente perda da base. O tipo mais comum   a perda de bases púricas, que ocorre na taxa de 5 mil perdas por célula, por dia. A perda de uma base púrica (A ou G)   denominada despurina o, enquanto a de uma base pirimídica (C ou T)   denominada despirimidina o.

A quebra de uma liga o N-glicosídica na cadeia polinucleotídica gera um sítio ap rico ou apirim dico e, na ausência da base para dirigir a entrada do nucleotídeo correspondente durante a síntese da cadeia complementar, qualquer um dos quatro tipos de nucleotídeos pode ser incorporado nesse local do DNA durante a replica o.

A perda de uma adenina, por exemplo, faz com que a molécula de DNA fique com uma base timina em uma das cadeias e com ausência da base complementar na outra cadeia. Caso esse DNA se replique antes que o erro seja corrigido, no local da despurina o pode ser introduzido qualquer um dos quatro tipos de nucleotídeos na cadeia sendo sintetizada. Nesse caso, a chance de altera o do par de bases naquele local   de 75%, pois em apenas 1/4 das vezes o nucleotídeo incorporado será o correto, no caso, com a base timina. (Fig. 3)

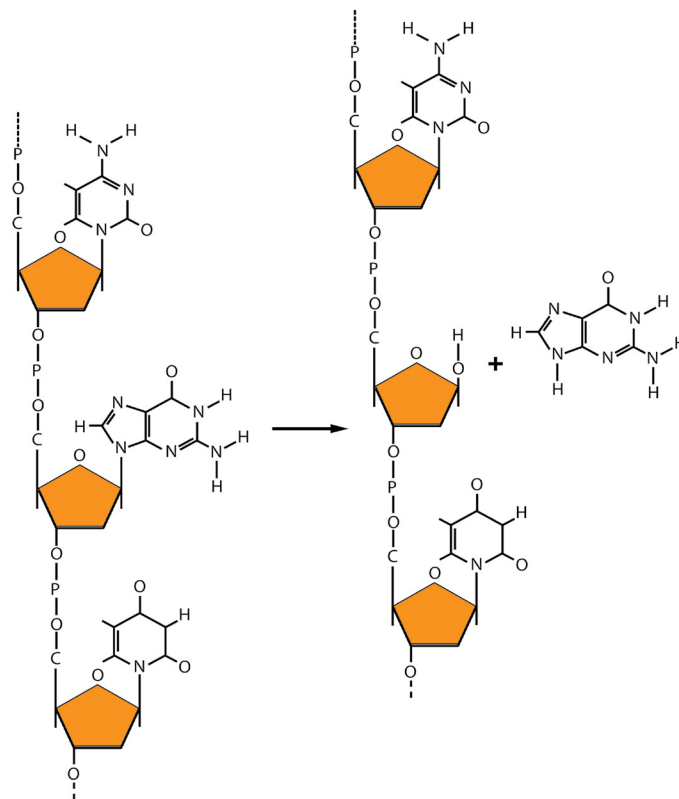


Figura 3. Representa o esquemática da rea o de perda de uma base pur ica (despurina o) em uma cadeia de DNA. Note que a cadeia  sacar-fosfato permanece intacta após a elimina o da base. Pode ocorrer ainda de, durante a replica o do DNA, ser adicionado um nucleotídeo a mais ou mesmo deixar de ser adicionado um nucleotídeo, de modo que a sequência de bases fica alterada.

3) Forma o de dímeros de timina

O DNA   particularmente susceptível   luz ultravioleta, a qual causa a forma o de liga es covalentes entre resíduos de pirimidina vizinhos, um fen meno denominado fotodimeriza o. Dos três tipos possíveis de dímeros de pirimidina (C-C, C-T ou T-T), o dímero de timina (T-T)   o que se forma com maior frequência. A presença de dímeros de pirimidina na cadeia molde bloqueia a a o das polimerases do DNA, impedindo assim a síntese da nova cadeia. (Fig. 4)

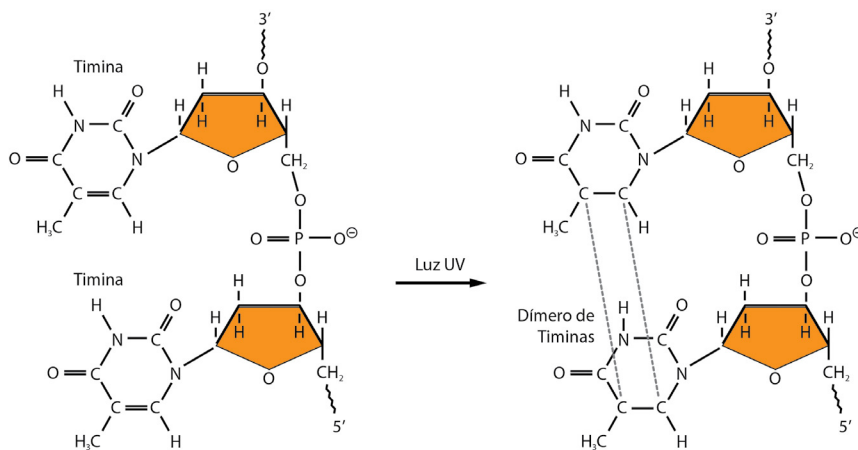


Figura 4. Rea o de fotodimeriza o entre dois resíduos de timina adjacentes. A luz ultravioleta induz a dimeriza o das timinas adjacentes.

A Origem das Muta es Induzidas: os Agentes Mutagênicos

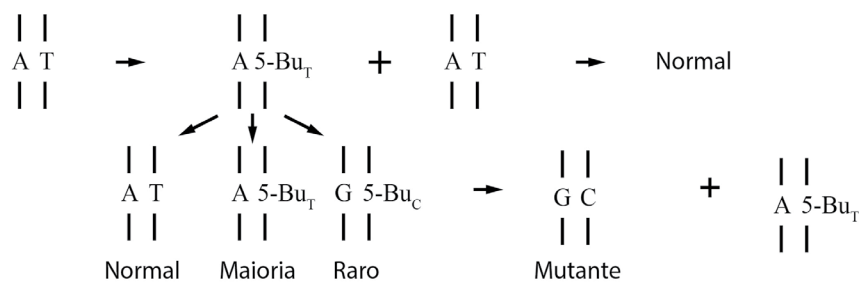
Agentes mutagênicos são substâncias químicas ou fatores de natureza física capazes de aumentar a taxa de muta o normal de um organismo.

Agentes mutagênicos químicos

Dentre as substâncias químicas mutagênicas conhecidas, destacam-se as chamadas bases análogas, que são compostos com estrutura molecular semelhante à das bases nitrogenadas normalmente encontradas no DNA e que, se estiverem presentes na célula, podem ser incorporadas durante a síntese do DNA. Por exemplo, a 5-bromouracila (5-BU) é um análogo da timina, diferindo dela por possuir um átomo de bromo na posição 5, em lugar do radical CH₃ da timina. Tal como a timina, em sua forma cetônica, a 5-bromouracila emparelha-se com a adenina, enquanto que em sua forma enólica ela se emparelha à guanina. Assim, se a 5-bromouracila for incorporada ao DNA na forma cetônica, ela substituirá a timina emparelhando-se com uma adenina. Durante a replicação seguinte, a 5-bromouracila pode, no entanto, passar para a forma enólica, fazendo com que a polimerase coloque uma guanina na fita que está sendo sintetizada, o que leva à substituição de um par A-T por um par G-C (Fig. 5a). Caso a 5-bromouracila seja incorporada em sua forma enólica, ela se emparelhará a uma guanina ocasionando a substituição de um par G-C por um par A-T. A presença do átomo de bromo, devido sua alta eletronegatividade, faz a 5-bromouracila passar do estado cetônico para o enólico e vice-versa mais frequentemente do que a timina: é isso que leva a um aumento da taxa de mutação. (Fig. 5)

Outra base análoga indutora de mutação é a 2-aminopurina. Essa base, em seu estado tautomérico normal, pode se comportar como uma adenina e emparelhar-se com a timina, o que acontece com maior frequência, ou pode se comportar como uma guanina e emparelhar-se com a citosina, o que ocorre mais raramente. O emparelhamento da 2-aminopurina com a timina não causa mutação. Porém, seu emparelhamento com uma citosina pode levar à substituição de um par A-T por um par G-C, ou vice-versa.

(a) Transição 1: AT → GC



(b) Transição 2: GC → AT

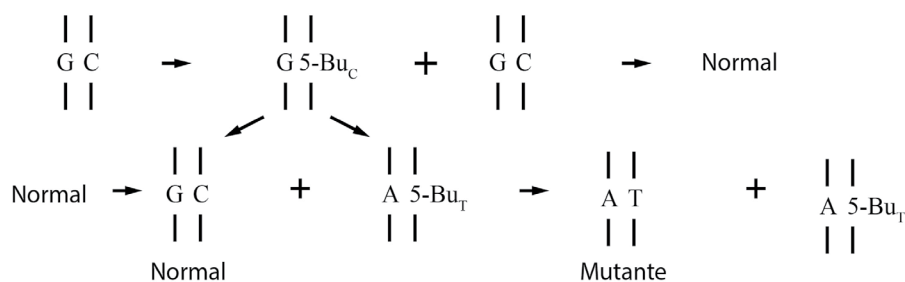


Figura 5. (a) Em seu estado normal ceto, a 5-BU emparelha-se com a adenina, comportando-se, como uma timina (5-BUT). Na forma enol, ela passa a se comportar como uma citosina (5-BUC), emparelhando-se com a guanina. Isso causa uma mutação tipo transição, em que um par de bases A-T é substituído por outro G-C. (b) Em seu estado raro enol, a 5-BU emparelha-se com a guanina, comportando-se como uma citosina (5-BUC). Na forma ceto, ela passa a se comportar como uma timina (5-BUT), emparelhando com a adenina. Isso causa uma mutação tipo transição, em que um par de bases G-C é substituído por outro A-T

O ácido nitroso (HNO₂) é outro exemplo de agente mutagênico, que atua por desaminação de bases e transforma adenina em hipoxantina, guanina em xantina ou citosina em uracila. A hipoxantina, por se emparelhar com a citosina, provoca a substituição de um par A-T por um par G-C. Já a transformação da citosina em uracila tem efeito oposto, provocando a substituição de um par G-C por um par A-T.

Esse tipo de mutação causada por bases análogas, pelo ácido nitroso e por diversas outras substâncias, em que uma base púrica é substituída por outra também púrica (A por G ou vice-versa) ou uma base pirimídica é substituída por outra também pirimídica (T por C ou vice-versa) é chamado de transição. Em contraposição

às transições temos as chamadas transversões, que são mutações onde uma base púrica é substituída por outra pirimídica ou vice-versa, ou seja, um par C-G é substituído por outro A-T ou vice-versa.

Agentes mutagênicos, como o etil-etano-sulfonato ou a hidrazina, que causam despurinação e despirimidinação, respectivamente, podem originar tanto transições como transversões. A explicação para esse fato é que durante a replicação do DNA, qualquer uma das quatro bases pode ocupar a posição correspondente à da base ausente e, na replicação seguinte, pode-se estabelecer tanto uma transição quanto uma transversão.

Uma outra classe de agentes mutagênicos químicos é a das substâncias intercalantes do DNA, como o corante acridina laranja. Essas substâncias se posicionam entre duas bases vizinhas de uma mesma cadeia da hélice do DNA, aumentando a distância entre elas e distorcendo a hélice. No caso de o agente estar intercalado em uma cadeia molde pode ocorrer, durante a síntese da cadeia complementar, a entrada de um nucleotídeo adicional correspondente ao maior espaço entre as bases, causado pela presença do agente. Já no caso de o agente se intercalar na cadeia em crescimento, pode acontecer de um nucleotídeo não ser adicionado. Assim, os agentes intercalantes causam mutações do tipo deleção ou inserção de bases.

Agentes mutagênicos físicos

Os agentes mutagênicos de natureza física mais importantes são os raios ultravioletas (luz UV) e as radiações ionizantes (dos tipos alfa, beta, gama, raios X, raios cósmicos e feixes de nêutrons).

A radiação UV a 260nm induz a dimerização de bases pirimídicas adjacentes, resultando em dímeros de ciclo-butil.

As radiações ionizantes, ao atravessarem as células, geram a ionização de compostos químicos celulares, moléculas reativas que são os responsáveis diretos pelas mutações. Nesses casos, a taxa de mutação induzida é diretamente proporcional à dose de radiação à qual o organismo foi submetido. Também não faz diferença se a radiação ionizante é administrada em uma dose única ou em diversas doses, o que importa é o total de radiação recebida pelo organismo, ou seja, as doses são aditivas. Dependendo do tipo de radiação e da sua intensidade, elas podem provocar inserções ou deleções pontuais, ou ainda danos mais graves ao DNA.

O calor também pode ser considerado um mutagênico físico, pois pode estimular a quebra das ligações B-N-glicosídicas que unem a base ao açúcar do nucleotídeo, o que resulta em sítio AP (apúrico ou apirimídico)

Reparo do DNA

Tanto as lesões no DNA (modificações químicas) como a incorporação de nucleotídeos errados durante sua síntese são erros que precisam ser rapidamente reparados para que não levem a mutações. Para isso, as células dispõem de inúmeros mecanismos de reparo do DNA, especializados na correção de diferentes tipos de alteração do DNA. Graças à extraordinária eficiência desses mecanismos de correção, menos de uma em cada 100 mil alterações de bases no DNA tem chance de se perpetuar, causando mutação.

Os mecanismos de reparo dependem fundamentalmente da estrutura dupla da molécula de DNA, no sentido de que a cadeia correta define os nucleotídeos que devem ser introduzidos em lugar dos incorretos na cadeia lesada. Assim, o mecanismo básico de reparo é a remoção dos nucleotídeos incorretos e a síntese de uma nova porção de DNA, tendo como molde a cadeia complementar correta, o que não é possível nos genomas constituídos por uma cadeia simples de ácido nucléico, como o de certos vírus.

O investimento das células nos mecanismos de reparo é bastante grande, basta dizer que em levedura já foram identificados centenas de genes diferentes que codificam proteínas envolvidas na salvaguarda do DNA. Apesar de menos conhecido, o investimento nos mecanismos de reparo em mamíferos parece ser pelo menos tão complexo quanto em levedura.

Mutações em genes envolvidos no reparo podem ser bastante graves. No caso humano, por exemplo, a doença conhecida como xeroderma pigmentoso, em que os indivíduos desenvolvem lesões graves na pele, inclusive câncer de pele, é resultado de deficiências no sistema de reparo; a pessoa afetada não consegue eliminar eficientemente os dímeros de pirimidinas que se formam nas células expostas às radiações ultravioleta presentes na luz solar.

Os sistemas de reparo costumam ser classificados em diversos tipos gerais, tais como reparo direto, reparo por excisão de nucleotídeos e reparo de erros de emparelhamento, entre outros.

1) Reparo de erros de emparelhamento entre bases (*mismatch*)

Um problema surge quando o sistema de reparo detecta um erro de emparelhamento entre duas bases que normalmente ocorrem na molécula de DNA, por exemplo, a existência de um par C-A ou T-G. Não existe mecanismo intrínseco de o sistema de reparo saber qual das bases do par   o tipo original e qual   o tipo mutante. O que o sistema detecta são duas bases não-complementares, sendo que qualquer uma delas pode ser substituída para sanar o erro. Caso a base errada seja a eliminada, restaura-se o tipo original, mas se ocorrer o inverso, a muta o   fixada.

As células dispõem de mecanismos que evitam a corre o errada de um par de bases normais incorretamente emparelhados. Por exemplo, em um par G-T a tendência   a substitui o do T com restabelecimento de um par G-C; isso ocorre porque, em geral, os pares G-T surgem por transforma o de C em T, decorrente da desamina o da citosina.

Um erro de emparelhamento por incorpora o errada de um nucleotídeo durante a replica o do DNA de *E. coli* pode ser corretamente corrigido, uma vez que existem mecanismos que permitem distinguir a cadeia recém-sintetizada da cadeia molde. O DNA bacteriano apresenta bases metiladas, ou seja, portadoras de grupos metil (-CH₃) introduzidos algum tempo depois da replica o. Assim, em uma molécula de DNA recém-replicada, a cadeia nova será não-metilada, enquanto que a cadeia molde apresentar  bases metiladas. No caso de ocorrer um par incorretamente emparelhado nesse DNA, um sistema específico de reparo remove um segmento da cadeia não-metilada da região que cont m o erro. O resultado   que a cadeia recém-sintetizada   corrigida de acordo com a sequência da cadeia parental.

2) Reparo direto

Esse tipo de reparo   raro e se caracteriza pela reversão ou remo o pura e simples da lesão.   o que ocorre, por exemplo, na remo o de dímeros de pirimidina na fotorreativa o. Nesse processo atua uma enzima ativada pela luz visível e que reconhece a distor o na hélice do DNA causada pela presença de dímeros de pirimidinas. Uma vez ligada ao DNA, a enzima absorve luz visível e catalisa a quebra dos dímeros de pirimidinas, revertendo as duas bases envolvidas na dimeriza o a suas formas originais. A enzima foi identificada em bactérias, fungos, plantas e alguns vertebrados, mas não ocorre em humanos. Os organismos que não têm a enzima que faz a fotorreativa o dependem de outros mecanismos de reparo para reverter os danos causados pela radia o UV.

3) Reparo por excisão de bases

A presença de bases modificadas no DNA   detectada por enzimas denominadas glicosilases. Essas enzimas catalisam a quebra da liga o N-glicosídica que liga o açúcar   base alterada e a eliminam do DNA. J  foram identificados vários tipos de glicosilases que reconhecem e eliminam, por exemplo, citosinas desaminadas, adeninas desaminadas, bases alquiladas, bases oxidadas, bases com anéis abertos e bases sem liga o duplas entre os carbonos.

A a o das glicosilases gera, portanto, sítios ap ricos ou apirimídicos. Esses são reconhecidos por uma endonuclease que quebra a cadeia portadora da lesão, removendo a desoxirribose-fosfato que perdeu a base nitrogenada. O resultado, em bactérias,   uma falha de um único nucleotídeo na cadeia de DNA, a qual   corrigida por a o da polimerase I e da ligase. (Fig. 6)

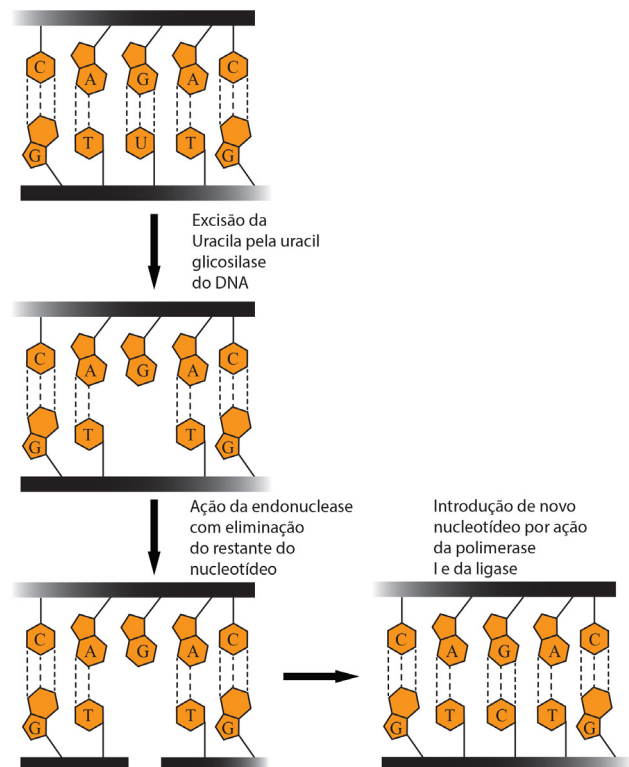


Figura 6. Etapas da remo o de uma uracila presente no DNA, a qual foi gerada por desamina o da citosina.

4) Reparo por excisão de nucleotídeos

Um dos mais importantes mecanismos de salvaguarda do DNA   o chamado reparo por excisão de nucleotídeos, em que complexos multienzimáticos removem uma grande diversidade de lesões que afetam o DNA. (Fig. 7)

O passo inicial no reparo por excisão   o reconhecimento por uma enzima de uma base danificada no DNA ou de uma altera o na estrutura da hélice. O passo seguinte   a excisão da seq ncia de nucleotídeos que cont m a lesão. Isso   feito por nucleases de reparo que hidrolisam as liga es fosfodiéster que unem os r sduos de nucleotídeos alterados ao resto da cadeia, removendo-os do DNA. Assim, a a o das nucleases de reparo deixa espaços na cadeia do DNA que apresentava o erro. As polimerases de reparo do DNA entram então em atividade usando a extremidade 3'OH livre da borda da falha como *primer* para a síntese de um novo segmento de DNA, tendo como molde a cadeia complementar correta. Após o espaço ter sido preenchido, uma ligase sela o *nick* deixado pela polimerase do DNA. Um exemplo de reparo por excisão de nucleotídeos ocorre na remo o de bases quimicamente modificadas. (Fig. 7)

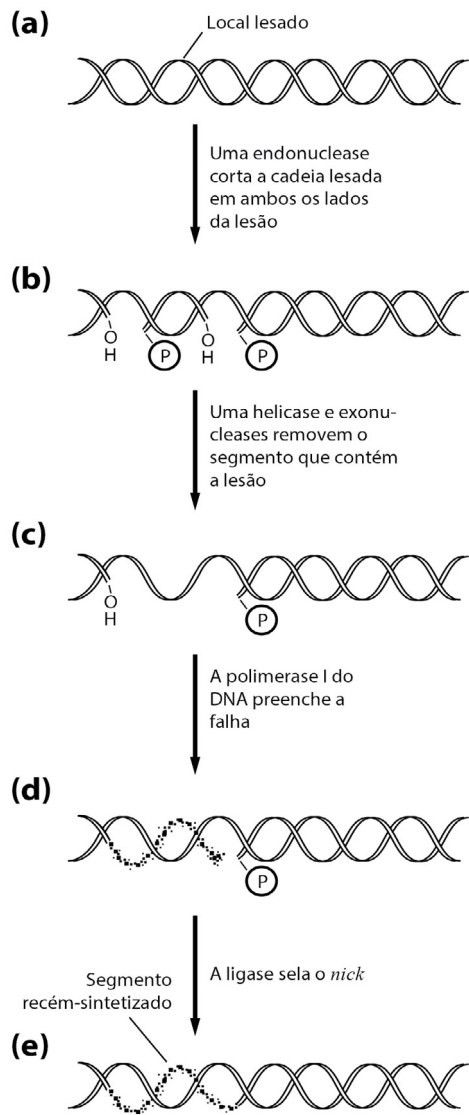


Figura 7. Esquema dos passos em uma rea o geral de reparo por excisão de nucleotídeo. (a) A presença de um dano no DNA   detectada por enzimas envolvidas no reparo por excisão. (b) Uma endonuclease introduz quebras na cadeia de DNA lesada em ambos os lados da lesão. (c) A seq ncia de bases contendo a lesão   removida pela a o conjunta de uma helicase e de exonucleases, o que deixa um espaço na hélice de DNA. (d) A falha   preenchida por a o da polimerase I do DNA, que utiliza a extremidade 3'OH livre como primer para a síntese do segmento de cadeia que preencher  a falha. (e) O *nick*   selado pela ligase do DNA

A forma o de dímeros de pirimidina   um tipo de lesão relativamente comum e precisa ser rapidamente removido pois impede a replica o normal do DNA. Assim, além do mecanismo de fotorreativa o, as células dispõem de um complexo multienzimático que monitora continuamente a hélice do DNA a procura de distor es causadas pela presença desses dímeros. Uma vez localizada a distor o na hélice do DNA, o esqueleto fosfodiéster da cadeia lesada   cortado em dois pontos que flanqueiam o dímero. O fragmento contendo o dímero  , então, retirado por a o de uma helicase e a falha resultante   preenchida por a o da polimerase de reparo do DNA (polimerase I em bactérias) e da ligase. (Fig. 8)

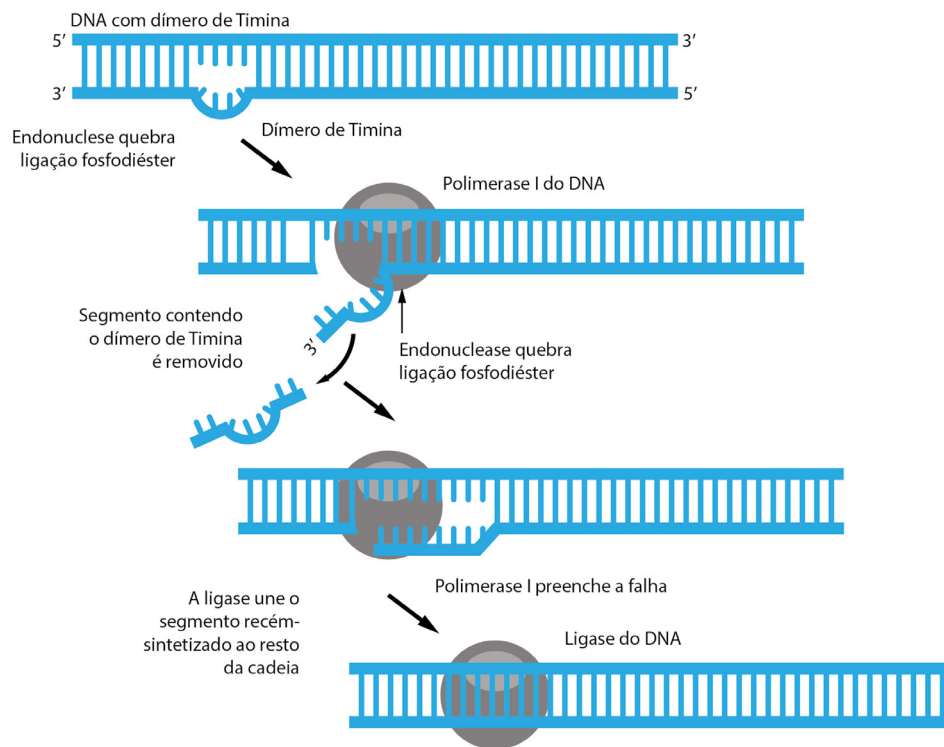


Figura 8. Mecanismo de elimina o de um dímero de timinas do DNA, por meio do reparo por excisão de nucleotídeos.

5) Reparo recombinacional ou reparo de quebras de dupla-fita.

Muitos dos mecanismos de reparo vistos até agora utilizam a fita de DNA complementar não danificada como molde para corrigir adequadamente a fita com lesão. Mas surge um problema quando ambas as fitas da dupla-cadeia do DNA estão quebradas. Este problema   resolvido por vias de reparo de quebras de DNA de dupla-fita, também chamado de reparo recombinacional. Uma via de reparo recombinacional retira informa es da seq ncia de DNA presentes na outra fita do DNA que se replica na mesma forquilha ou presentes no cromossomo homólogo. O sistema de reparo recombinacional pode ser ativado quando o aparato de replica o do DNA não   capaz de prosseguir com a síntese de DNA, especialmente em casos de quebra da fita dupla ou liga o cruzada entre as duas fitas do DNA. A polimerase do DNA não acrescenta nucleotídeos   região oposta   lesão, deixando um espaço em branco na cadeia recém-sintetizada. Esta descontinuidade   então preenchida com DNA parental oriundo da outra fita do DNA ou do cromossomo homólogo, por um processo de recombina o. Isto gera uma descontinuidade do DNA parental, que pode ser reparada por polimerase do DNA seguida da a o da ligase; A Figura 9 mostra um caso de reparo recombinacional no caso de forquilha de replica o que ficou "emperrada" e com um espaço não replicado por causa de lesão.

Reparo recombinacional

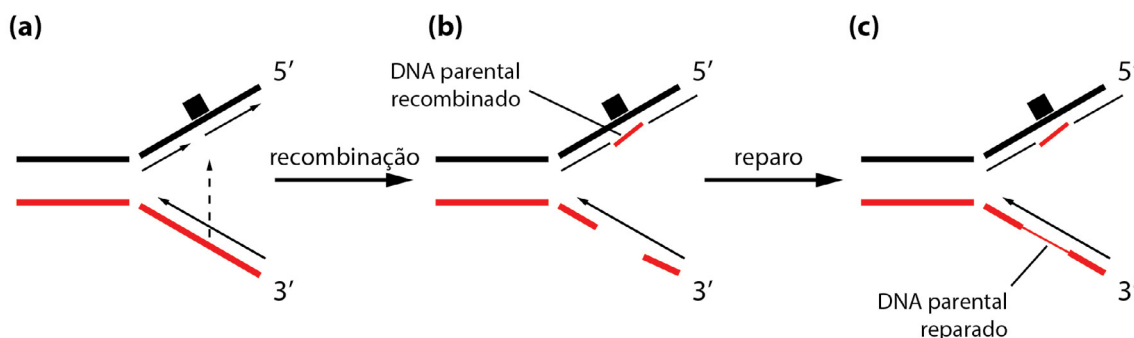


Figura 9. Reparo recombinacional preenchendo espaços não replicados nas cadeias de DNA.

Sistemas de reparo induzíveis em bactérias

As bactérias possuem sistemas induzíveis de reparo, isto  , as enzimas envolvidas no reparo são são sintetizadas quando ocorrem danos específicos no DNA.

O sistema induzível de reparo melhor conhecido   a chamada resposta SOS em *E. coli*. Esse sistema   ativado quando a replica o do DNA   interrompida pela presença de danos na molécula de DNA, como dímeros de pirimidinas ou liga es cruzadas induzidas por agentes alquilantes. O resultado da resposta SOS   um aumento na capacidade de reparo de danos no DNA.

A resposta SOS consiste no aumento da transcri o de mais de quinze genes, muitos dos quais codificam para proteínas envolvidas no reparo do DNA. O primeiro passo nesse processo   a ativa o de uma proteína chamada RecA. Não se sabe ainda como a interrup o da síntese de DNA ativa essa proteína. A ativa o da proteína RecA causa a quebra de uma outra proteína chamada LexA, que normalmente bloqueia a transcri o dos outros genes participantes da resposta SOS. A rea o de quebra da proteína LexA   bem incomum, uma vez que   ela mesma que se destrói por uma atividade auto-catalítica ativada pela proteína RecA. Assim, a ativa o da proteína RecA desbloqueia os genes envolvidos na resposta SOS, fazendo com que eles passem a produzir proteínas envolvidas no reparo das lesões que impedem a replica o do DNA e que se não forem corrigidas podem resultar na morte da célula.

Existe pelo menos um sistema conhecido de reparo induzível em leveduras.

EXERCÍCIOS

Parte A: Revendo Conceitos Básicos

Preencha os espaços em branco nas frases de 1 a 10 usando o termo abaixo mais apropriado:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| (a) agente genotóxico | (f) fotodimeriza o |
| (b) desamina o de bases | (g) liga o N-glicosídica |
| (c) despirimidina o | (h) muta o |
| (d) despurina o | (i) sítio apirim dico |
| (e) dímero de pirimidina | (j) sítio ap rico |

- ()   um nome genérico atribuído a qualquer agente que cause altera es químicas no DNA.
- A elimina o de base adenina ou guanina de uma molécula de ácido nucléico   chamada ().
- A elimina o de um grupo -NH₂ de uma base nitrogenada   chamada ().
- ()   qualquer altera o hereditária na molécula do DNA.
- A forma o de liga es covalentes entre citosinas e timinas vizinhas resulta em um(a) ().
- Uma base nitrogenada mant m-se unida a uma pentose por meio de um(a) ().
- A elimina o de base citosina, timina ou uracila da molécula de ácido nucléico   chamada ().
- O local de uma molécula de ácido nucléico de onde foi eliminada uma adenina ou uma guanina   chamado ().
- O local de uma molécula de ácido nucléico de onde foi eliminada uma citosina, timina ou uracila   chamado ().
- A forma o de liga es covalentes entre bases pirimídicas vizinhas por a o de luz UV   chamada ().

Preencha os espaços em branco nas frases 11 a 16 usando o termo abaixo mais apropriado:

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| (a) agente mutagênico | (e) resposta SOS |
| (b) base análoga | (f) glicosilase |
| (c) substância intercalante | (g) transição |
| (d) endonuclease de reparo | (h) transversão |

11. () é qualquer fator que cause uma alteração hereditária no DNA.
12. Um composto com estrutura molecular semelhante a uma das cinco bases nitrogenadas e que pode ser incorporado em seu lugar durante a síntese de um ácido nucléico é chamada ().
13. Um composto que se une a uma molécula de ácido nucléico introduzindo-se entre as bases nitrogenadas é chamado ().
14. () é uma enzima que hidrolisa ligações fosfodiéster que unem os resíduos de nucleotídeos alterados ao resto da cadeia, removendo-os do DNA.
15. () é uma enzima que hidrolisa a ligação que une o açúcar de um resíduo de nucleotídeo a uma base alterada, removendo-a do DNA.
16. () é um sistema de reparo induzível da bactéria *E. coli*.

Preencha os espaços em branco nas frases 17 a 21 usando o termo abaixo mais apropriado:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| (a) mutação espontânea | (d) mutação somática |
| (b) mutação induzida | (e) mutação germinativa |
| (c) mutação silenciosa | |

17. Uma alteração hereditária no DNA de uma célula não pertencente à linhagem que dará origem às células reprodutivas é uma ().
18. Qualquer alteração hereditária no DNA de uma célula pertencente à linhagem que originará células reprodutivas é uma ().
19. Uma alteração hereditária no DNA que não causa alteração no organismo é chamada ().
20. () é uma alteração hereditária no DNA que surge sem que o organismo tenha sido submetido a nenhum tratamento especial.
21. () é uma alteração hereditária no DNA cujo aparecimento está relacionado à exposição do indivíduo a condições físicas ou a substâncias químicas que lesam ácidos nucléicos.

Parte B: Ligando Conceitos e Fatos

Indique a alternativa mais apropriada para completar as frases 22 e 23.

22. A estabilidade dos genes é devida à
- constante formação de tautômeros.
 - eficiência dos sistemas de reparo.
 - presença de bases análogas que impedem mutação.
 - alta velocidade de replicação do DNA.

23. Um evento que ocorre durante a replicação do DNA e que não ocasiona mutação está mencionado na alternativa ().
- Abertura da hélice de DNA.
 - Incorporação de um nucleotídeo a mais.
 - Incorporação de nucleotídeo errado.
 - Tautomerização de bases.

Para cada uma das frases listadas nas questões 24 a 36 escreva no parêntesis: a letra V, caso a afirmação seja verdadeira, ou a letra F, no caso dela ser falsa.

24. Uma mutação pode resultar na inativação de uma proteína essencial cuja ausência causa a morte da célula. ()
25. Toda mutação produz um efeito fenotípico. ()
26. Em geral, as mutações criam formas gênicas melhoradas ou com funções novas. ()
27. A adaptação de uma espécie ao ambiente pode ser melhorada por mutações. ()
28. Muitas das alterações espontâneas que ocorrem no DNA são temporárias porque são rapidamente corrigidas por processos chamados coletivamente de “reparo do DNA”. ()
29. Um modo de se estimar taxa de mutação é comparar a sequência de aminoácidos de uma mesma proteína em diferentes espécies. ()
30. Apenas mutações germinativas podem originar células que se reproduzem descontroladamente resultando em câncer. ()
31. As células germinativas precisam ser protegidas contra altas taxas de mutação para manutenção da espécie. ()
32. As células somáticas precisam ser protegidas contra altas taxas de mutação para manutenção do indivíduo. ()
33. Desaminação de citosina origina uracila e pode levar a uma transversão. ()
34. O mecanismo básico de reparo é a remoção dos nucleotídeos alterados e a síntese de nova porção de DNA complementar à cadeia intacta. ()
35. Existe uma grande diversidade de mecanismos de reparo, mas todos dependem da existência de duas cópias da informação genética, uma em cada cromossomo de um par de homólogos de um organismo diplóide. ()
36. A principal função do sistema SOS de *Escherichia coli* é aumentar a sobrevivência da célula pela introdução de novas mutações que anulam os efeitos do dano no DNA. ()

Utilize as alternativas abaixo para responder as questões 37 a 42.

- | | |
|-------------------------|----------------------|
| (a) mutação espontânea | (c) mutação induzida |
| (b) mutação germinativa | (d) mutação somática |
37. Alterações hereditárias no DNA de uma célula que originará um esporângio de uma samambaia são exemplos de ().

38. Alterações hereditárias no DNA de uma célula mãe-de-grão de pólen são exemplos de ().
39. Alterações hereditárias no DNA de uma célula do tubo neural de um embrião são exemplos de ().
40. Alterações hereditárias no DNA de uma célula da medula óssea, que originará as células sanguíneas, são exemplos de ().
41. Alterações hereditárias no DNA dos sobreviventes do bombardeio de Hiroshima na Segunda Guerra Mundial são consideradas ().
42. Alterações hereditárias que surgem em indivíduos de uma população natural são exemplos de ().

Parte C: Aplicando Conceitos

43. Defina os termos:
- transições e transversões.
 - mutações espontâneas e mutações induzidas.
 - mutações somáticas e mutações germinativas.
44. Esquematize dois mecanismos por meio dos quais agentes intercalantes do DNA causam inserção de bases.
45. Descreva como a célula repara uma despurinação no DNA.
46. Descreva como a célula pode reparar um dímero de timina no DNA.

Parte D: Resolvendo Problemas

47. Qual é a razão de se admitir que as taxas de mutação seriam muito altas caso o DNA tivesse uracila em lugar de timina?
48. Explique porque a uracil N-glicosilase não consegue reparar danos quando uma citosina metilada é desaminada a timina.
49. Como sua resposta à questão anterior está relacionada com a observação de que são observadas taxas altas de mutação em sítios do DNA onde a citosina encontra-se metilada?
50. Explique porque células expostas à luz visível, após exposição à luz ultravioleta, têm uma taxa de sobrevivência maior do que células mantidas no escuro após a exposição à luz UV.
51. Em geral, vírus cujo material genético é constituído por cadeias simples de ácidos nucleicos acumulam mutações muito mais rapidamente do que vírus cujo material genético é constituído por ácidos nucleicos de cadeia dupla. Proponha uma hipótese para explicar essa observação.
52. O oxigênio da posição 6 da guanina faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio 4 da citosina. Quando ocorre a metilação da posição 6 da guanina, a guanina tende a emparelhar com adenina. Represente em um esquema como pode ser gerada uma mutação neste caso.
53. Sabendo que a 8-oxoguanina tende a emparelhar com adenina, que tipo de mutação (transição ou transversão) esta alteração induz caso não seja reparada?

54. Leia a reportagem abaixo:

SOBREVIVENTES DE HIROSHIMA FAZEM APELO CONTRA TESTES

SÃO PAULO - Sobreviventes da 2^a Guerra Mundial fizeram nesta semana, em São Paulo, um ato contra testes at micos. O médico Hiroo Dohy, presidente do Hicare, Conselho Internacional de Hiroshima para tratamento das vítimas de radia o, fez um apelo pela suspensão de todos os testes at micos, como os atualmente programados em Nevada, nos Estados Unidos. O médico participou de seminário no Hospital Santa Cruz, onde recebem acompanhamento especializado muitas das 130 vítimas das bombas at micas lançadas sobre o Japão que hoje residem no Brasil. O acompanhamento constante das vítimas continua necessário, parcialmente subsidiado por mecanismos implantados pela Província de Hiroshima, inclusive para residentes no Brasil. (...)

Os especialistas explicaram que as bombas lançadas em Hiroshima e Nagasaki eram diferentes e deixaram sequelas distintas. A primeira era de urânio e provocou 140 mil mortos até dezembro de 1945, a fase mais aguda dos efeitos, deixando 80 mil feridos. A de Nagasaki, de plut nio, provocou 70 mil mortos e 80 mil feridos. No total, estima-se 400 mil vítimas.

Estudos acurados efetuados até hoje (...) mostram que a fase aguda das muitas leucemias foi encerrada em torno de 1965, com a morte das vítimas. Hoje, os sobreviventes sofrem com vários tipos de câncer e outras doenças, mais do que a popula o em geral. Dados detalham as diferenças de efeitos considerando a idade em que as vítimas foram afetadas, bem como as distâncias em que encontravam do epicentro das explosões das bombas, classificando o grau das radia es a que foram expostas. Até o momento, não se constatou sequelas entre os descendentes destas vítimas, e as cidades de Hiroshima e Nagasaki não apresentam mais resíduos de radia o.

O estudo disponível no Japão    nico. Não há similares sobre as vítimas de Chernobyl ou de Goiânia, no Brasil. Nem das vítimas dos testes norte-americanos no Atol de Bikini, no Pacífico.

Fonte: O Estado de São Paulo, 13 de outubro de 2007

- a. Indique, no texto, as informa es apresentadas sobre a ocorrências de muta es somáticas e de muta es germinativas entre os afetados pela radia o ionizante das bombas at micas.
- b. Explique como poderia ser investigado se uma popula o exposta   radia o, por exemplo, sobrevivente do ataque com bomba, tem de fato uma taxa de muta o germinativa mais elevada que uma popula o que não foi exposta.