

Mutações, Agentes Mutagênicos e Sistemas de Reparo

2.1 Mutações 49

- 2.1.1 Conceito e tipos 49
 - 2.1.1.1 Mutações gênicas 49
 - 2.1.1.2 Mutações ou alterações cromossômicas 52

2.2 Agentes mutagênicos 58

- 2.2.1 Agentes físicos 58
 - 2.2.1.1 Radiações ionizantes 58
 - 2.2.1.2 Radiações ultravioleta 60
 - 2.2.1.3 Efeitos biológicos das radiações 61
- 2.2.2 Substâncias químicas 61

2.3 Sistemas de reparo 64

- 2.3.1 Reparo direto 64
- 2.3.2 Reparo por excisão 64
- 2.3.3 Reparo por recombinação homóloga 65
- 2.3.4 Reparo por junção de extremidades não homólogas 66
- 2.3.5 Reparo por subunidades catalíticas da DNA-polimerase 66

Como mencionado abaixo o reparo por fotorreativação não ocorre em humanos. Mas em humanos há um mecanismo de reparo direto que envolve as enzimas alquiltransferases. Essas enzimas também revertem as lesões diretamente. Elas removem determinados grupos alquila que foram adicionados à posição O-6 da guanina por mutágenos tais como nitrosoguanidina e etilmetanossulfonato. Essa enzima transfere o grupo metil da O-6-metilguanina para um resíduo de cisteína no sítio ativo da enzima. Entretanto, a transferência inativa a enzima e, assim, esse sistema de reparo pode ser saturado se o nível de alquilação for suficiente alto (retirado de Griffiths et al 2016)

2.3 Sistemas de reparo

Qualquer dano que introduza uma alteração na dupla-hélice do DNA representa uma ameaça à constituição genética da célula. Em geral, esse dano é reconhecido e corrigido por sistemas de reparo tão complexos e importantes para a célula quanto o mecanismo de replicação do DNA. No entanto, esses sistemas podem falhar, e, nesse caso, o dano em questão se converte em uma mutação, com possíveis consequências prejudiciais à célula.

A importância do reparo do DNA em eucariotos é comprovada pela identificação de mais de uma centena de genes de reparo no genoma humano. Os sistemas de reparo podem ser classificados em vários tipos, apresentados na **Figura 2.16**.

2.3.1 Reparo direto

O reparo direto é raro e envolve a reversão ou a simples remoção do dano. Um exemplo é o *reparo por fotorreativação*, em que o dano causado pela luz UV (formação de dímeros de timina) é parcialmente revertido se as células lesadas forem expostas à luz azul do espectro visível, dependendo também da clivagem das ligações entre

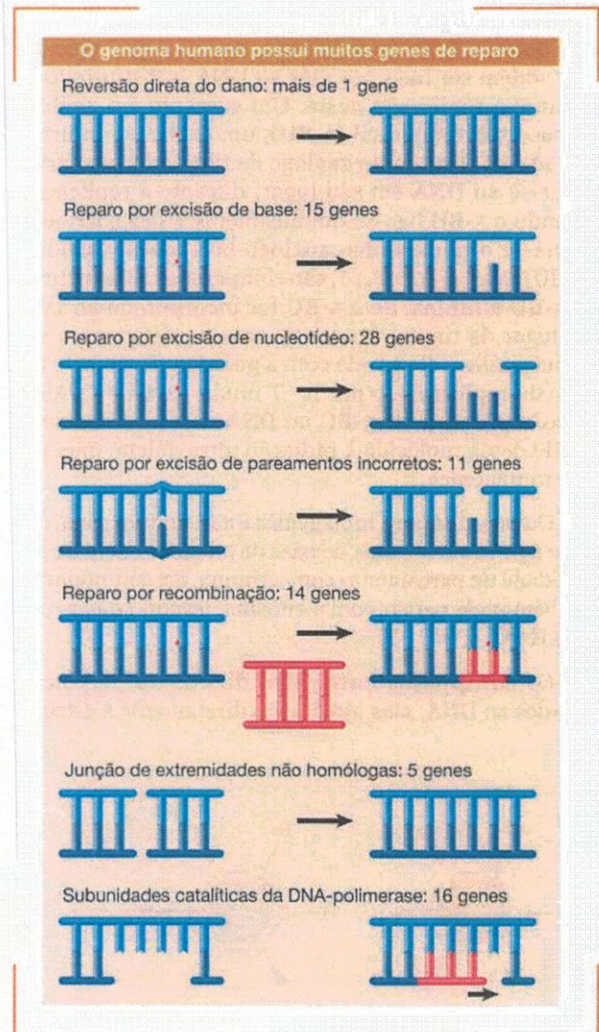


Figura 2.16

Os genes de reparo podem ser classificados em vias que utilizam diferentes mecanismos para reverter ou desviar do DNA danificado.

Fonte: Lewin.³

os dímeros de timina por uma enzima de fotorreativação denominada PRE (do inglês, *photoreactivation enzyme*). Esse sistema de reparo é encontrado na natureza, especialmente em plantas, mas não é observado em humanos e outros organismos.

2.3.2 Reparo por excisão

Os sistemas de *reparo por excisão* podem ser subdivididos em *reparo por excisão de base*, *reparo por excisão de nucleotídeo* e *reparo de pareamento incorreto*. Os reparos por excisão de base e de nucleotídeo consistem nos

seguintes passos: (a) o dano presente em uma das fitas de DNA é reconhecido e eliminado enzimaticamente por uma endonuclease; (b) uma DNA-polimerase preenche esse espaço com a inserção de nucleotídeos complementares aos da fita intacta usada como molde replicativo; (c) a DNA-ligase sela o “corte”, fechando o espaço. O primeiro subtipo corrige o dano causado às bases nitrogenadas pela hidrólise espontânea ou por ação de substâncias químicas; o segundo corrige lesões do DNA que alteram ou distorcem a dupla-hélice, como no caso dos dímeros de pirimidinas (ver seção 2.2.1.2 deste capítulo).

No caso do dano causado pela radiação ultravioleta em humanos, o reparo por excisão de nucleotídeo é mais complexo, envolvendo vários genes e proteínas. Grande parte do conhecimento desse subtipo de reparo foi obtida por meio de estudos minuciosos de pacientes com **xeroderma pigmentosa**, uma doença autossômica recessiva caracterizada por sardas, nódulos córneos e áreas de atrofia na pele, bem como profunda sensibilidade à luz solar, que predispõe os afetados a anormalidades na pele e câncer (ver síndromes de deficiência do reparo do DNA, no Cap. 12). Há pelo menos sete genes envolvidos no reparo por excisão de nucleotídeo (*XPA* a *XPG*, genes de xeroderma pigmentosa de *A* a *G*). Um complexo proteico que inclui produtos de vários genes *XP* é responsável pela excisão dos dímeros de timina. De modo simplificado, esse reparo se inicia pelo desenrolamento das fitas de DNA junto à lesão por um fator de transcrição ($TF_{II}H$) e produtos de alguns genes *XP* com atividade de **helicases**; em seguida, **endonucleases** codificadas por outros genes *XP* quebram a sequência de DNA que contém o

dímero, enquanto uma **exonuclease** remove os nucleotídeos alterados. Na segunda etapa desse reparo, há a reconstrução do trecho removido, com o auxílio de uma **DNA-polimerase**, e sua união à cadeia nucleotídica, pela ação de uma **DNA-ligase** (Fig. 2.17).

Os pacientes com xeroderma pigmentosa são incapazes de produzir as endonucleases específicas para o dímero de pirimidina, por isso as lesões não são reparadas, e os raios solares ultravioleta provocam queimaduras que frequentemente evoluem para tumores letais.

O reparo de pareamento incorreto é realizado pela varredura do DNA em busca de bases que não estão pareadas adequadamente. Nos pareamentos incorretos que surgem durante a replicação, em geral a sequência de fitas recém-sintetizadas (“fitas novas”) é corrigida, mediante reparo por excisão semelhante aos já descritos.

2.3.3 Reparo por recombinação homóloga

Esse tipo de reparo lida com quebras da dupla-hélice do DNA em eucariotos, em consequência de exposição a radiações ionizantes, por exemplo. Esses danos podem levar a rearranjos cromossômicos, doenças síndrômicas (como a anemia de Fanconi e a ataxia-telangiectasia; ver Cap. 12) e morte celular.

O primeiro passo desse processo envolve uma enzima que reconhece a quebra da fita dupla e digere as extremidades 5' da hélice de DNA rompida, deixando pendentes as extremidades 3'. Uma dessas extremidades procura uma região de complementaridade na cromátide-irmã e,

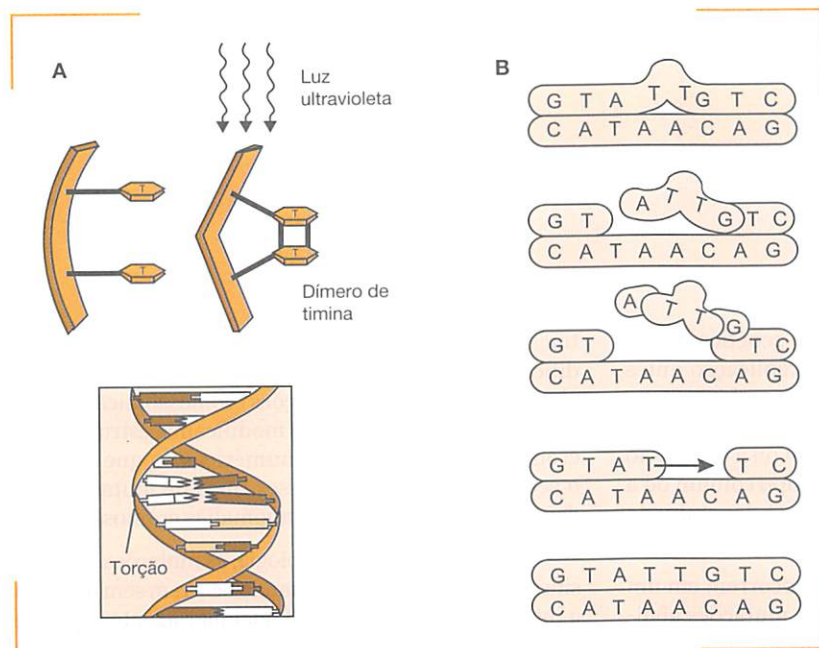


Figura 2.17

Reparo do DNA por excisão de nucleotídeos. **A** – Sob a ação da luz ultravioleta, podem-se formar dímeros de pirimidinas (timina ou citosina), por meio de ligações covalentes entre bases pirimídicas adjacentes, os quais deformam o DNA, impedindo o pareamento normal de bases. **B** – O dímero e as bases adjacentes são cortados pelas endonucleases, removidos pela exonuclease e substituídos por nova sequência idêntica, com o auxílio da DNA-polimerase e da DNA-ligase e usando-se como molde o filamento complementar de DNA.

Fonte: Jorde e colaboradores.⁸

então, invade a região homóloga da cromátide-irmã, alinhando as sequências complementares. Assim, a síntese de DNA continua a partir da extremidade 3' pendente, na região danificada, usando a fita íntegra de DNA como molde. Essa interação entre as cromátides-irmãs é necessária porque, como ambas as fitas de uma hélice de DNA estão rompidas, não existe uma fita parental íntegra que possa servir de sequência-molde para o reparo. A seguir, a molécula heterodúplice é resolvida, e as cromátides-irmãs se separam. Esse processo de reparo ocorre geralmente após a replicação do DNA, no fim da fase S ou na fase G2 do ciclo celular, momento em que as cromátides-irmãs estão disponíveis para serem utilizadas como mol-des para o reparo; por isso se diz que o reparo por recom-binação homóloga é acurado (**Fig. 2.18**).

2.3.4 Reparo por junção de extremidades não homólogas

É também um tipo de reparo de quebra da dupla-hélice do DNA, em que o sistema pode unir extremidades de DNA não homólogas. Esse sistema é ativado na fase G1 do ciclo celular, portanto antes da replicação do DNA; como algumas sequências nucleotídicas são perdidas no momento da junção, diz-se que esse sistema de reparo é sujeito a erros.

2.3.5 Reparo por subunidades catalíticas da DNA-polimerase

Muitas DNA-polimerases podem ressintetizar segmen-tos de DNA, para reposição. Em geral, essas enzimas utilizam-se do mecanismo de revisão para verificar as se-quências das fitas-filhas e remover erros.

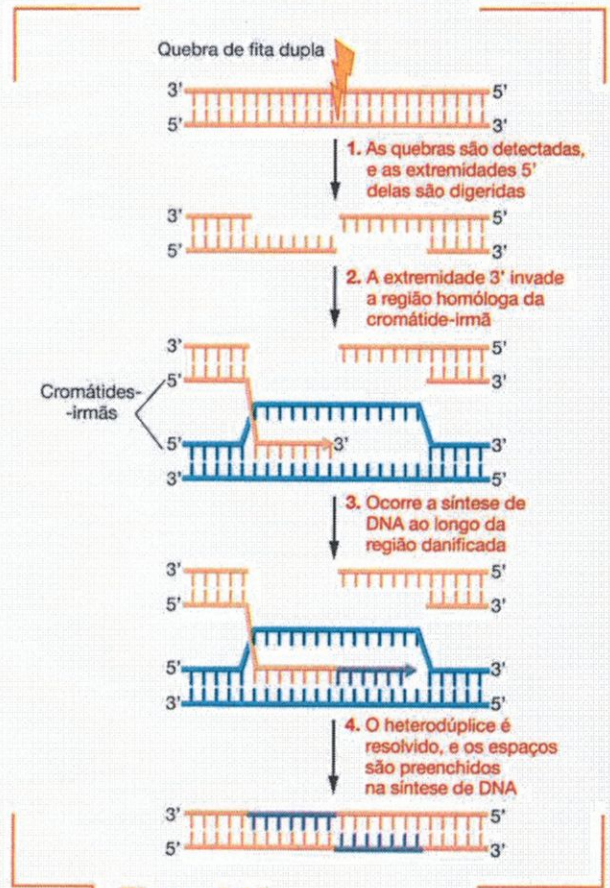


Figura 2.18

Etapas do reparo de quebras de fita dupla por recombinação homóloga.

Fonte: Klug e colaboradores.⁷

Resumo

As alterações hereditárias da estrutura genética de um organismo, decorrentes de erros de replicação, erros de recombinação e não ocorrência por recombinação ou quebra de fita, são denominadas mutações. O termo mutação refere-se a um fenótipo decorrente da expressão de uma nova sequência gênica. O fenômeno oposto ao de mutação, isto é, a restauração da estrutura genética original, é denominado reversão.

As mutações hereditárias que ocorrem em um gene podem ser chamadas mutações gênicas, pois se localizam no genoma, que pode ser dividido em

três regiões: a região de controle, a região de expressão e a região de armazenamento. Quando as mutações ocorrem na região de controle, elas afetam a expressão do gene, mas não a sua estrutura. Quando as mutações ocorrem na região de expressão, elas afetam a estrutura do gene, mas não a sua expressão. Quando as mutações ocorrem na região de armazenamento, elas afetam a estrutura do gene, mas não a sua expressão.

As mutações hereditárias que ocorrem em um gene podem ser chamadas mutações gênicas, pois se localizam no genoma, que pode ser dividido em

Griffiths et al 2016

Introdução a Genética

11a Edição

Editora Guanabara - Koogan

Reparo pós-replicação | Reparo de malpareamento

Você aprendeu na primeira metade deste capítulo que ocorrem muitos erros na replicação do DNA. De fato, a taxa de erro é de aproximadamente 10^{-5} . A correção por meio da função de revisão 3' para 5' da polimerase replicativa reduz a taxa de erro para menos de 10^{-7} . A principal via que corrige os erros replicativos remanescentes é denominada **reparo de malpareamento**. Essa via de reparo reduz a taxa de erro para menos de 10^{-9} ao reconhecer e reparar as bases malpareadas e as pequenas alças causadas pela inserção e pela deleção de nucleotídeos (indels) no período da replicação. A partir desses valores, você pode verificar que as mutações que levam à perda da via de reparo de malpareamento poderiam aumentar a frequência de mutações em 100 vezes. De fato, a perda do reparo de malpareamento também está associada a formas hereditárias de câncer de cólon.

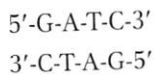
Os sistemas de reparo de malpareamento devem realizar no mínimo três coisas:

1. Reconhecer pares de bases malpareados.
2. Determinar qual base é a incorreta no malpareamento.
3. Excisar a base incorreta e realizar a síntese de reparo.

A maior parte do que se sabe a respeito do reparo de malpareamento tem origem em décadas de análises genéticas e bioquímicas com a utilização da bactéria-modelo *E. coli* (ver Organismo-modelo, *E. coli*, no Capítulo 5). Especialmente digna de nota foi a reconstituição do sistema de reparo de malpareamento em tubo de ensaio no laboratório de Paul Modrich. A conservação de muitas das proteínas de reparo de malpareamento, de bactérias e leveduras até seres humanos, indica que essa via é antiga e importante em todos os organismos vivos. Recentemente, o sistema de reparo de malpareamento humano também foi reconstituído em tubo de ensaio no laboratório de Modrich. A capacidade de estudar os detalhes da reação estimulará futuros estudos sobre a via humana. Entretanto, por enquanto enfocaremos o sistema muito bem-caracterizado de *E. coli* (Figura 16.23).

A primeira etapa no reparo de malpareamento é o reconhecimento do dano no DNA recém-replicado pela proteína MutS. A ligação dessa proteína às distorções na dupla-hélice de DNA causadas por bases incompatíveis inicia a via de reparo de malpareamento ao atrair três outras proteínas para o sítio da lesão (MutL, MutH e UvrD [não demonstrada]). A proteína-chave é MutH, que realiza a função crucial de cortar o filamento que contém a base incorreta. Sem essa capacidade de discriminação entre as bases corretas e incorretas, o sistema de reparo de malpareamento não poderia determinar qual base deve ser excisada para evitar o surgimento de uma mutação. Se, por exemplo, ocorre malpareamento entre G-T como um erro de replicação, como o sistema consegue determinar se G ou T está incorreto? Ambas são bases normais no DNA. Mas os erros de replicação produzem pareamentos errados no filamento recém-sintetizado e, assim, o sistema de reparo de malpareamento substitui a base naquele filamento.

Como o reparo de malpareamento distingue o filamento recém-sintetizado do antigo? Relembre do Capítulo 12 que as bases citosina com frequência são metiladas em eucariotos e que essa marca epigenética é propagada do filamento parental para o filho logo após a replicação. O DNA de *E. coli* também é metilado, mas os grupos metil relevantes para o reparo de malpareamento são adicionados às bases adenina. Para distinguir o filamento-molde antigo do filamento recém-sintetizado, o sistema de reparo bacteriano se aproveita de um atraso na metilação da sequência a seguir:



A enzima responsável pela metilação é a adenina metilase, que cria a 6-metiladenina em cada filamento. Entretanto, a adenina metilase necessita de diversos minutos para reconhecer e modificar os trechos de GATC recém-sintetizados. Nesse intervalo, a proteína MutH corta o sítio de metilação no filamento que contém A ainda não metilada. Esse sítio pode estar a diversas centenas de pares de bases de distância da base erroneamente pareada. Após o corte no sítio, a proteína UvrD se liga ao corte e utiliza a sua atividade de helicase para desenrolar o DNA. Uma proteína de ligação

O reparo de malpareamento corrige os erros replicativos

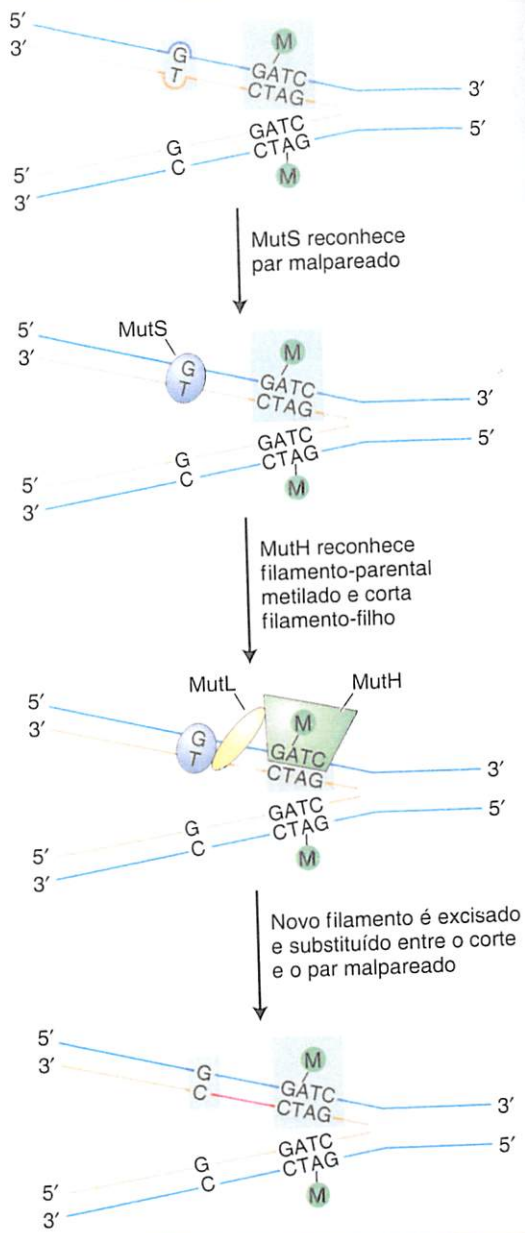


FIGURA 16.23 Modelo em relação ao reparo de malpareamento em *E. coli*. O DNA é metilado (Me) no resíduo A na sequência GATC. A replicação do DNA produz um dúplice hemimetilado que existe até que a metilase consiga modificar o filamento recém-sintetizado. O sistema de reparo de malpareamento realiza quaisquer correções necessárias com base na sequência observada no filamento metilado (modelo original). MutS, MutH e MutL são proteínas.

a filamento único protetora reveste o filamento parental desenrolado, enquanto a parte do novo filamento entre o pareamento errado e o corte é excisada.

Muitas das proteínas no reparo de malpareamento de *E. coli* são conservadas no reparo de malpareamento humano. No entanto, como os eucariotos reconhecem e reparam apenas o filamento recém-sintetizado ainda é desconhecido. O problema causa perplexidade nos organismos sem a maior

BOX 4.1 The Health Consequences of Defective DNA Damage Response/DNA Repair.

DNA damage accumulates in all of us throughout our lives. Inevitably, as we grow older, the incidence of somatic mutations increases, with consequences for increased risk of developing cancer and of declining efficiency in a variety of cellular processes, contributing to the aging process. More than 170 human genes are known to be involved in DNA damage responses and DNA repair (see Further Reading), and a wide variety of single-gene disorders have been described that result from germ-line mutations in genes that work in these pathways (Table 1 gives some examples).

As expected, increased susceptibility to cancer and accelerated aging are often found in these disorders, but a significant number have developmental abnormalities, and neurological features are very common. Although many cell types are regularly replaced, nondividing neurons are especially vulnerable. They have high oxygen and energy needs (with a resulting high frequency of oxidative damage), and they accumulate DNA damage over very long periods. In addition to various clinical features, cellular abnormalities are frequently seen, with respect to chromosome and genome instability as listed below.

Disease features

- **Cancer (C) susceptibility.** Not surprisingly, this is apparent in many inherited DNA repair deficiencies. Genome instability in mismatch repair deficiencies can induce cancer in highly proliferating tissues, notably intestinal epithelium. Individuals with xeroderma pigmentosum have little protection against UV radiation, and exposure to sunlight induces skin tumors (Figure 1A).
- **Progeria (P).** Some disorders have clinical features that mimic accelerated aging, notably individuals with Werner syndrome (Figure 1B), who prematurely develop gray hair, cataracts, osteoporosis, type II diabetes, and atherosclerosis, and generally die before the age of 50 as a result of cancer or atherosclerosis.
- **Neurological (N) features.** Neuronal death and neurodegeneration are common features. Individuals with ataxia telangiectasia experience cerebellar degeneration leading to profound ataxia and become confined to a wheelchair before the age

DNA REPAIR/DNA DAMAGE RESPONSE SYSTEM	SINGLE-GENE DISORDERS	DISEASE FEATURES ^a			
		C	P	N	I
Mismatch repair	hereditary nonpolyposis colorectal cancers (Lynch syndrome)	+	-	-	-
Nucleotide excision repair (NER)	xeroderma pigmentosum	+	-	+	-
NER (transcription-coupled repair)	Cockayne syndrome	-	+	+	-
	trichothiodystrophy	-	+	+	-
Single-strand break (SSB) repair	ataxia oculomotor apraxia 1	-	-	+	-
	spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy I	-	-	+	-
Interstrand cross-link repair	Fanconi anemia	+	+	+	+
Double-strand break (DSB) repair (NHEJ)	Lig4 syndrome	+	-	+	+
	severe combined immunodeficiency	-	-	-	+
DNA damage signaling/DSB repair	ataxia telangiectasia	+	-	+	+
	Seckel syndrome	-	-	+	+
	primary microcephaly 1	-	-	+	-
Homologous recombination (HR)	Bloom syndrome	+	-	+	+
Telomere maintenance (TM)	dyskeratosis congenita	+	+	+	+
Base excision repair (BER) in mtDNA	spinocerebellar ataxia-epilepsy	-	-	+	-
	progressive external ophthalmoplegia	-	-	-	-
HR, BER, TM	Werner syndrome	+	+	-	-

Table 1 Examples of inherited disorders of DNA repair/DNA damage responses. ^aC, cancer susceptibility; P, progeria;

N, neurological features; I, immunodeficiency.

BOX 4.1 (continued)

of 10. Microcephaly is found in many disorders, sometimes accompanied by evidence of neurodegeneration and learning difficulties.

- **Immunodeficiency (I).** As described in Table 4.2 and Section 4.3, some proteins that work in DNA repair also function in specialized genetic mechanisms that occur exclusively in B and T lymphocytes. For example, the production of immunoglobulin and T-cell receptors requires components of the NHEJ repair pathway, and deficiency of these components typically results in hypogammaglobulinemia and lymphopenia or severe combined immunodeficiency.

Cell analyses revealing genome and chromosomal instability

The DNA of individuals with disorders of mismatch repair (described in Section 10.3) shows striking evidence of genome instability when short tandem repeat DNA polymorphisms known as microsatellite DNA are assayed. Cells from individuals with a DNA

repair disorder quite often also show an increased frequency of spontaneous chromosome aberrations that can be characteristic of the disorder, as in the case of ataxia telangiectasia, Fanconi anemia, and Bloom syndrome (which shows very high levels of sister chromatid exchange).

Chromosome analyses can also provide a simple route to laboratory-based diagnosis. Fanconi anemia (which is characterized by the variable presence of assorted developmental abnormalities, plus progressive bone marrow failure and an increased risk of malignancy) can be caused by mutations in any one of at least 13 different genes that work to repair interstrand cross-links, making DNA-based diagnosis difficult. Chromosome-based diagnosis is more straightforward: lymphocyte cultures are treated with diepoxybutane or mitomycin C—chemicals that induce DNA interstrand cross-links—and chromosomes are analyzed for evidence of chromatid breakage, which can produce characteristic abnormal chromosome formations (Figure 1C).



Figure 1 Examples of abnormal phenotypes in DNA-repair disorders. (A) Extensive skin cancer in xeroderma pigmentosum. (B) Accelerated aging in Werner syndrome—portraits of the same woman at age 13 (left) and age 56 (right). (C) Characteristic quadriradial and triradial chromosome formations in Fanconi anemia cells after treatment with mitomycin C. (A, courtesy of Himynameislax (CC BY-SA 3.0).

B, from Hisama FM, Bohr VA, and Oshima J [2006] *Sci Aging Knowl Environ* 10:pe18. With permission from the AAAS (left) and the International Registry of Werner Syndrome (right). C, courtesy of Niall Howlett from Harney JA, Shimamura A and Howlett NG [2008] *Pediatr Health* 2:175–187. With permission from Future Medicine Ltd.)

Sometimes, DNA lesions may be identified but are not repaired before DNA replication (damage tolerance). For example, DNA lesions that block DNA replication may be bypassed rather than repaired, and non-classical DNA polymerases are required to resume DNA synthesis past the damaged site (*translesion synthesis*). Subsequently, the gap in the daughter strand opposite the lesion is filled in; the lesion can be repaired later on, by using the daughter strand as a template in nucleotide excision repair. The non-classical DNA polymerases used in translesion synthesis exhibit