

QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo

Guia de estudos

Aula 9: Ácidos nucleicos

Seguindo o padrão adotado temos as leituras básica, complementar e avançada, retiradas de D.L. Nelson e M.M. Cox - Princípios de Bioquímica de Lehninger, 7ª ed. (Artmed, 2018). Atente-se para o fato de que as leituras estão mais divididas neste capítulo, ou seja, há diversas leituras básicas até o fim do texto, intercalada por leituras complementares e avançadas. Ao fim do arquivo há um texto sobre o ATP pois este é um nucleotídeo.

Nucleotídeos e Ácidos Nucleicos

Início leitura básica

- 8.1 Alguns dados básicos 281
- 8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos 287
- 8.3 Química dos ácidos nucleicos 297
- 8.4 Outras funções dos nucleotídeos 306

Nucleotídeos apresentam uma variedade de funções no metabolismo celular. Eles são a moeda energética nas transações metabólicas; são as ligações químicas essenciais nas respostas da célula a hormônios e a outros estímulos extracelulares; e também são os componentes estruturais de uma estrutura ordenada de cofatores enzimáticos e intermediários metabólicos. E, por último, mas não menos importante, eles são os constituintes dos ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), os repositórios moleculares da informação genética. A estrutura de cada proteína – e, em última análise, de cada biomolécula e componente celular – é o produto da informação programada na sequência nucleotídica dos ácidos nucleicos da célula. A capacidade de armazenar e transmitir a informação genética de uma geração a outra é uma condição fundamental para a vida.

Este capítulo fornece uma visão geral da natureza química dos nucleotídeos e ácidos nucleicos encontrados na maioria das células; uma abordagem mais detalhada da função dos ácidos nucleicos é o foco da Parte III deste texto.

8.1 Alguns dados básicos

Nucleotídeos, os blocos de construção dos ácidos nucleicos A sequência de aminoácidos de cada proteína na célula e a sequência nucleotídica de cada RNA são especificadas pela sequência nucleotídica do DNA da célula. Um segmento de uma molécula de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biologicamente funcional, seja proteína ou RNA, é denominado **gene**. Uma célula costuma ter muitos milhares de genes, e moléculas de DNA, não surpreendentemente, tendem a ser muito grandes. O armazenamento e a transferência da informação biológica são as únicas funções conhecidas do DNA.

O RNA tem uma ampla variedade de funções e muitas classes são encontradas nas células. Os **RNA ribos-**

somais (rRNAs) são componentes dos ribossomos, os complexos que executam a síntese proteica. Os **RNAs mensageiros (mRNAs)** são intermediários, carregando a informação genética de um ou poucos genes para o ribossomo, onde as proteínas correspondentes podem ser sintetizadas. Os **RNAs transportadores (tRNAs)** são moléculas adaptadoras que traduzem fielmente a informação no mRNA em uma sequência específica de aminoácidos. Além dessas classes maiores, existe uma grande variedade de tipos de RNA com funções especiais, descritos detalhadamente na Parte III.

Nucleotídeos e ácidos nucleicos têm pentoses e bases características

Os **nucleotídeos** apresentam três componentes característicos: (1) uma base nitrogenada (contendo nitrogênio), (2) uma pentose e (3) um ou mais fosfatos (**Figura 8-1**). A molécula sem o grupo fosfato é denominada **nucleosídeo**. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos re-

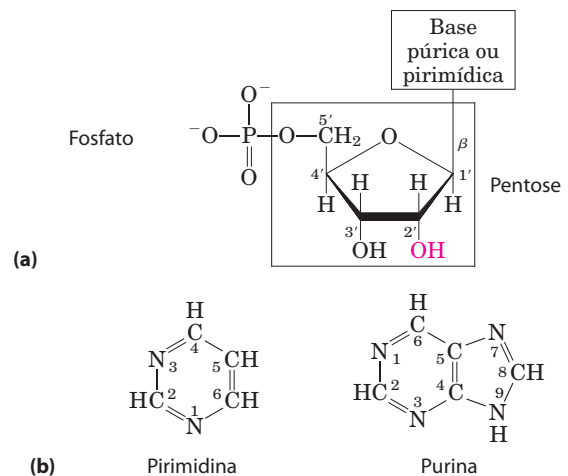


FIGURA 8-1 Estrutura de nucleotídeos. (a) A estrutura geral mostrando a convenção numérica do anel de pentose. Esse é um ribonucleotídeo. Nos desoxirribonucleotídeos, o grupo —OH no carbono 2' (vermelho) é substituído por H. (b) Os compostos ancestrais das bases pirimídicas e púricas dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos, mostrando a convenção numérica.

lacionados, a **pirimidina** e a **purina**. As bases e as pentoses dos nucleotídeos comuns são compostos heterocíclicos.

CONVENÇÃO-CHAVE: Os átomos de carbono e de nitrogênio nas estruturas relacionadas são numerados convencionalmente para facilitar a denominação e a identificação dos muitos compostos derivados. A convenção para o anel da pentose segue as regras descritas no Capítulo 7, mas, nas pentoses dos nucleotídeos e nucleosídeos, os números dos carbonos recebem a designação de um apóstrofo (') para diferenciá-los dos átomos numerados nas bases nitrogenadas. ■

A base de um nucleotídeo é ligada covalentemente (no N-1 das pirimidinas e no N-9 das purinas) por uma ligação *N-β*-glicosídica ao carbono 1' da pentose, e o fosfato é esterificado no carbono 5'. A ligação *N-β*-glicosídica é formada pela remoção dos elementos de água (um grupo hidroxila da pentose e o hidrogênio da base), como na formação da ligação *O*-glicosídica (ver Figura 7-30).

Tanto o DNA quanto o RNA contêm duas bases púricas principais, **adenina** (A) e **guanina** (G), e duas pirimídicas. No DNA e no RNA, uma das pirimidinas é a **citossina** (C), mas a segunda pirimidina não é a mesma nos dois: é a **timina** (T) no DNA e a **uracila** (U) no RNA. Apenas raramente a timina é encontrada no RNA ou a uracila no DNA. As estruturas das cinco principais bases estão mostradas na **Figura 8-2**, e a nomenclatura de seus nucleotídeos e nucleosídeos correspondentes está resumida na Tabela 8-1.

Os ácidos nucleicos têm dois tipos de pentoses. As recorrentes unidades desoxirribonucleotídicas do DNA contêm 2'-desóxi-D-ribose e as unidades ribonucleotídicas do RNA contêm D-ribose. Nos nucleotídeos, ambos os tipos de pentoses estão na sua forma *β*-furanose (anel fechado com cinco átomos). Como mostra a **Figura 8-3**, o anel de pentose não é planar, mas ocorre em uma série de conformações geralmente descritas como “pregueadas”.

CONVENÇÃO-CHAVE: Embora o DNA e do RNA pareçam ter duas diferenças – pentoses diferentes e a presença de ura-

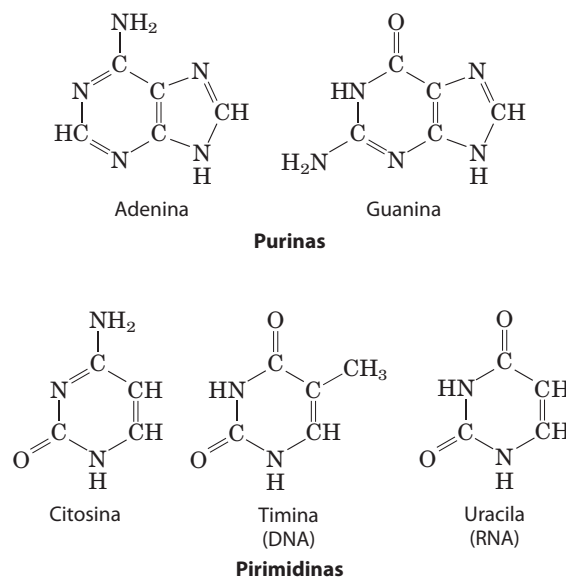


FIGURA 8-2 Principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos. Alguns dos nomes comuns dessas bases refletem as circunstâncias das suas descobertas. A guanina, por exemplo, foi primeiramente isolada de guano (esterco de pássaro) e a timina foi isolada originariamente de tecido do timo.

cila no RNA e timina no DNA – é a pentose que define a identidade do ácido nucleico. Se o ácido nucleico contém 2'-desóxi-D-ribose, é DNA por definição, embora possa apresentar alguma uracila. Da mesma forma, se o ácido nucleico contém D-ribose é RNA, independentemente da sua composição de base. ■

A **Figura 8-4** mostra as estruturas e os nomes dos quatro principais **desoxirribonucleotídeos** (desoxirribonucleosídeo 5'-monofosfato), as unidades estruturais dos DNAs, e os quatro principais **ribonucleotídeos** (ribonucleosídeo 5'-monofosfato), as unidades estruturais dos RNAs.

Término leitura básica

TABELA 8-1 Nomenclatura de nucleotídeo e de ácido nucleico

Base	Nucleosídeo	Nucleotídeo	Ácido nucleico
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilato	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	DNA
Guanina	Guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina ou desoxitimidina	Timidilato ou desoxitimidilato	DNA
Uracila	Uridina	Uridilato	RNA

Nota: “Nucleosídeo” e “nucleotídeo” são termos genéricos que incluem ambas as formas ribo ou desoxiribo. Também, ribonucleosídeos ou ribonucleotídeos são aqui designados simplesmente como nucleosídeos e nucleotídeos (p. ex., riboadenosina como adenosina), e desoxirribonucleosídeos e desoxirribonucleotídeos como desoxinucleosídeos e desoxinucleotídeos (p. ex., desoxirriboadenosina como desoxiadenosina). Ambas as formas de denominação são aceitas, mas os nomes mais curtos são mais comumente usados. A timina é uma exceção; “ribotimidina” é usado para descrever sua ocorrência incomum no RNA.

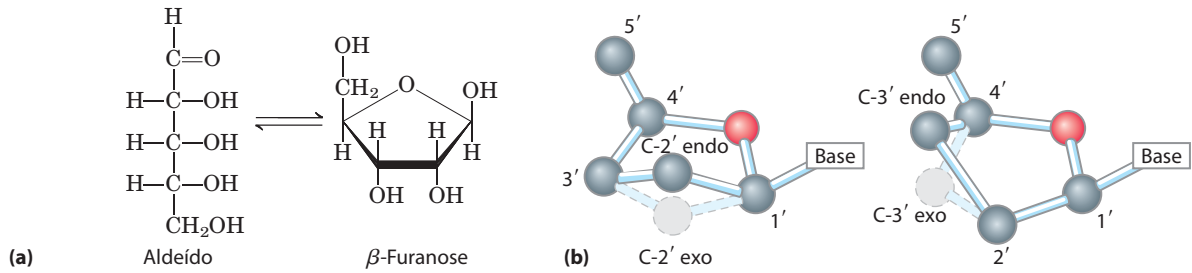


FIGURA 8-3 Conformação da ribose. (a) Em solução, as formas de cadeia reta (aldeído) e em anel (β -furanose) da ribose livre estão em equilíbrio. O RNA contém apenas a forma em anel, a β -D-ribofuranose. A desoxirribose sofre uma interconversão semelhante em solução, mas no DNA existe apenas a β -2'-desoxi-D-ribofuranose. (b) Os anéis de ribofuranose nos nucleótidos podem existir em quatro diferentes conformações pregueadas. Em todos os casos, quatro dos cinco átomos estão em uma forma planar. O quinto átomo (C-2' ou C-3') está no mesmo lado (endo) ou no lado oposto (exo) do plano em relação ao átomo de C-5'.

deos podem existir em quatro diferentes conformações pregueadas. Em todos os casos, quatro dos cinco átomos estão em uma forma planar. O quinto átomo (C-2' ou C-3') está no mesmo lado (endo) ou no lado oposto (exo) do plano em relação ao átomo de C-5'.

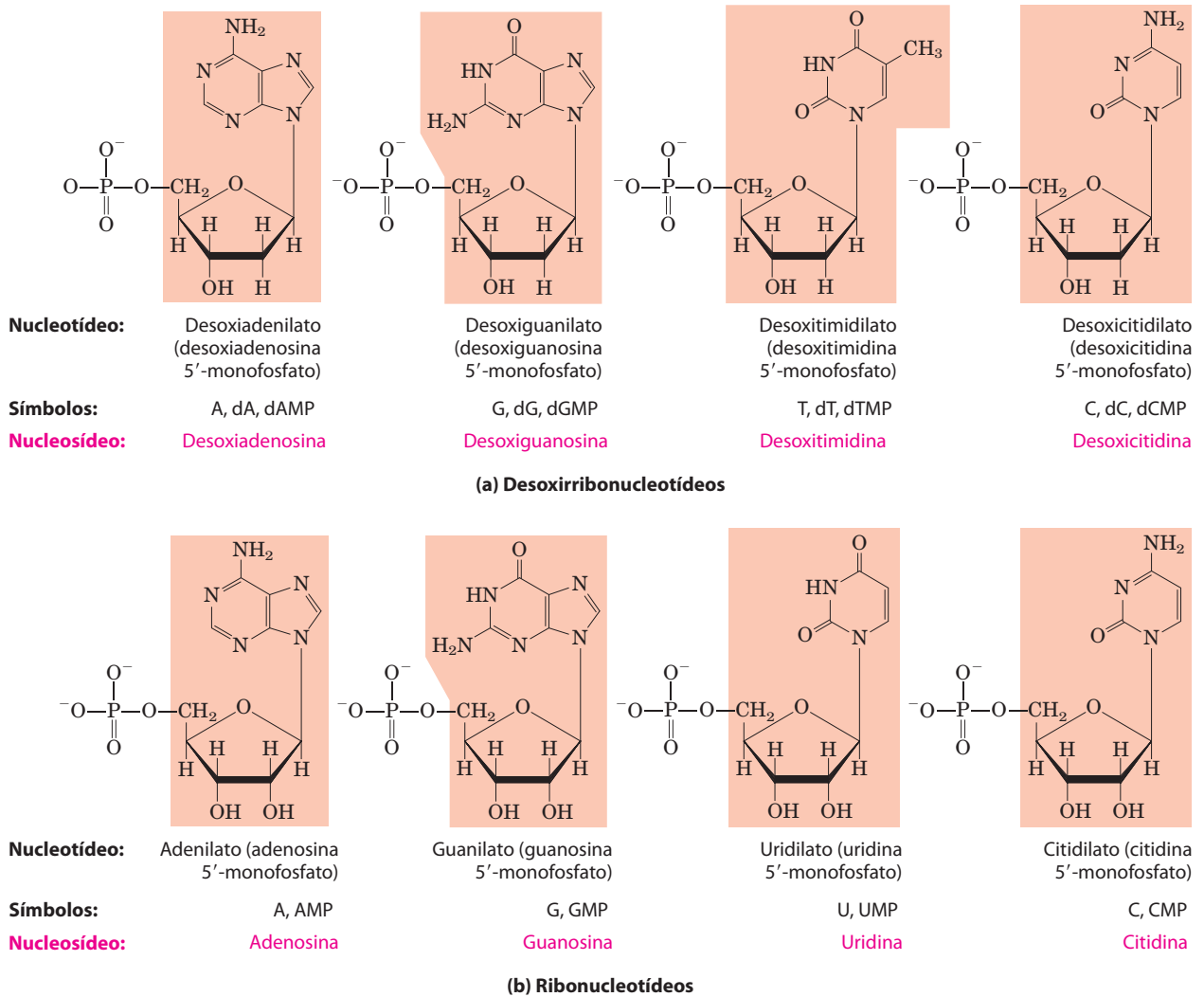


FIGURA 8-4 Desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos dos ácidos nucleicos. Todos os nucleotídeos estão mostrados nas suas formas livres em pH 7,0. As unidades nucleotídicas do DNA (a) são em geral simbolizadas como A, G, T e C e, algumas vezes, como dA, dG, dT e dC; aquelas do RNA (b) como A, G, U e C. Na sua forma livre, os desoxirribonucleotídeos são comumente abreviados como dAMP, dGMP, dTMP e dCMP; os ribonucleotídeos,

AMP, GMP, TMP e CMP. Para cada nucleotídeo, os nomes comuns são seguidos pelo nome completo entre parênteses. Todas as abreviaturas assumem que o grupamento fosfato está na posição 5'. A porção nucleosídica de cada molécula está sombreada em cor salmão. Nesta e nas próximas ilustrações, os carbonos do anel não estão mostrados.

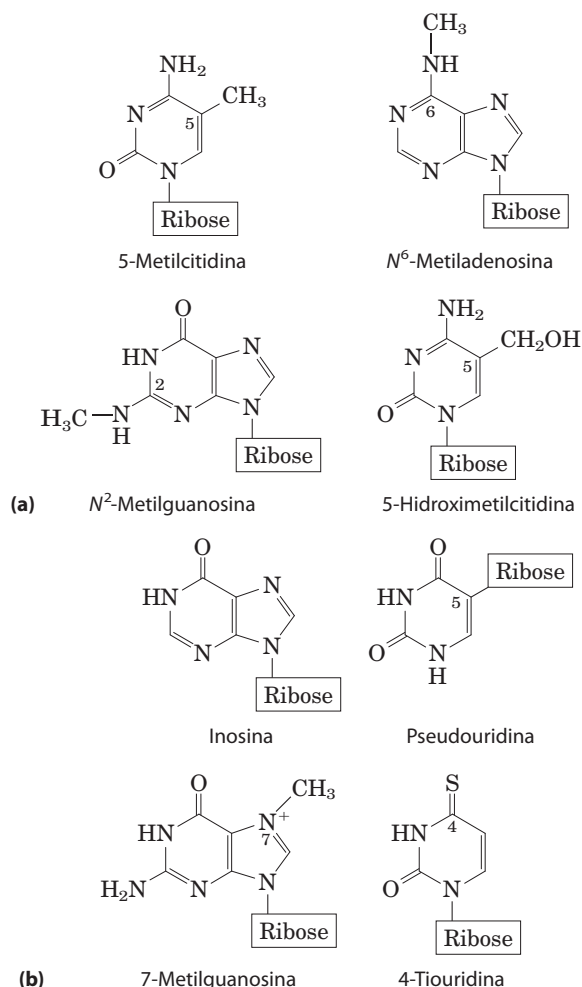


FIGURA 8-5 Algumas bases púricas e pirimídicas secundárias, mostradas como nucleosídeos. (a) Bases secundárias do DNA. A 5-metilcitidina ocorre no DNA de animais e de plantas superiores, a N^6 -metiladenosina no DNA bacteriano e a 5-hidroximetilcitidina no DNA de animais e bactérias infectadas por determinados bacteriófagos. (b) Algumas bases secundárias do tRNA. A inosina contém a base hipoxantina. Observe que a pseudouridina, como a uridina, contém uracila; elas são diferentes no ponto de ligação à ribose – na uridina, a uracila é ligada pelo N-1, o ponto de ligação usual para pirimidinas; na pseudouridina, pelo C-5.

início leitura complementar

Embora os nucleotídeos que contêm as principais purinas e pirimidinas sejam os mais comuns, o DNA e o RNA também contêm algumas bases secundárias (Figura 8-5). No DNA, as mais comuns delas são as formas metiladas das bases principais; em alguns DNA virais, algumas bases podem ser hidroximetiladas ou glicosiladas. As bases alteradas ou raras na molécula de DNA muitas vezes apresentam funções na regulação ou na proteção da informação genética. Bases secundárias de muitos tipos também são encontradas nos RNAs, especialmente nos tRNAs (ver Figuras 8-25 e 26-22).

CONVENÇÃO-CHAVE: A nomenclatura para as bases secundárias pode ser confusa. Assim como as bases principais, muitas têm nomes comuns – hipoxantina, por exemplo, mostrada como seu nucleosídeo inosina na Figura 8-5. Quando um átomo no anel púrico ou pirimídico é substituído, a con-

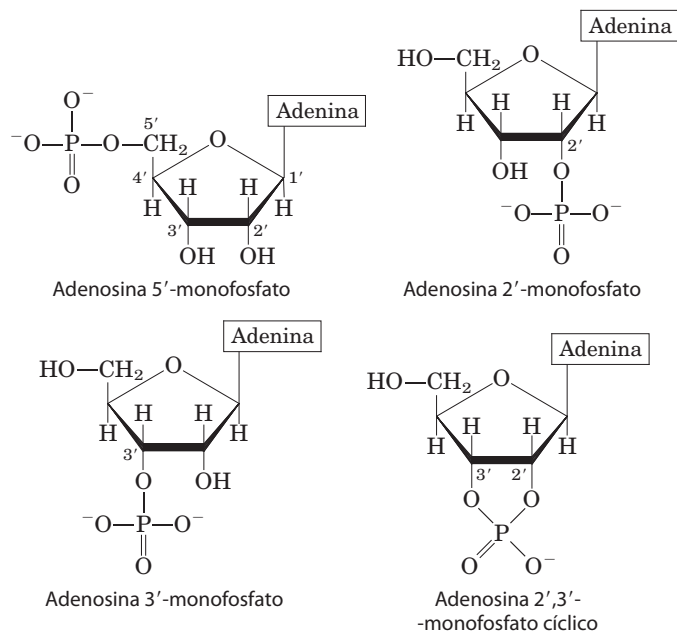


FIGURA 8-6 Algumas adenosina monofosfatos. Adenosina 2'-monofosfato, adenosina 3'-monofosfato e adenosina 2',3'-monofosfato cíclico são formados por hidrólise enzimática e alcalina do RNA.

venção usual (utilizada aqui) é simplesmente para indicar a posição no anel do átomo substituído pelo seu número – por exemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina e 5-hidroximetilcitosina (mostrados como nucleosídeos na Figura 8-5). O elemento ao qual o átomo substituído é ligado (N, C, O) não é identificado. A convenção muda quando o átomo substituído é exocíclico (não se encontra dentro da estrutura cíclica), nesse caso o tipo de átomo é identificado e a posição no anel no qual ele é ligado é indicada por sobrescrito. O nitrogênio amino ligado ao C-6 da adenina é N^6 ; da mesma forma, o oxigênio da carbonila e o nitrogênio amino no C-6 e no C-2 da guanina são O^6 e N^2 , respectivamente. Exemplos dessa nomenclatura são N^6 -metiladenosina e N^2 -metilguanina (Figura 8-5). ■

As células também contêm nucleotídeos com grupos fosfato em posições diferentes do carbono 5' (Figura 8-6). Os **ribonucleosídeos 2',3'-monofosfato cíclicos** são intermediários isoláveis e os **ribonucleosídeos 3'-monofosfato** são os produtos finais de hidrólise do RNA por certas ribonucleases. Outras variações são adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e guanina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), considerados no final deste capítulo.

término leitura complementar

Ligações fosfodiéster ligam nucleotídeos consecutivos nos ácidos nucleicos

Início leitura básica

Os nucleotídeos consecutivos de ambos DNA e RNA são ligados covalentemente por “pontes” de grupos fosfato, nas quais o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3'-hidroxila do próximo nucleotídeo, criando uma **ligação fosfodiéster** (Figura 8-7). Portanto, o esqueleto covalente dos ácidos nucleicos consiste em fosfatos e resíduos de pentose alternados, e as

bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais ligados ao esqueleto em intervalos regulares. O esqueleto do DNA e do RNA são hidrofílicos. Os grupos hidroxila dos resíduos de açúcar formam ligações de hidrogênio com a água. Os grupos fosfato, com um pK_a próximo a 0, são completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7, e as cargas negativas são, de um modo geral, neutralizadas pelas interações iônicas com cargas positivas nas proteínas, nos íons metálicos e nas poliaminas.

CONVENÇÃO-CHAVE: Todas as ligações fosfodiéster no DNA e no RNA têm a mesma orientação ao longo da cadeia (Figura 8-7), conferindo a cada fita do ácido nucleico uma polaridade específica e extremidades 5' e 3' diferentes. Por definição, a **extremidade 5'** não apresenta um nucleotídeo na posição 5', e a **extremidade 3'** não apresenta um nucleotídeo na posição 3'. Outros grupos (mais frequentemente um ou mais fosfatos) podem estar presentes em uma ou em ambas as extremidades. A orientação 5' para 3' de uma fita de ácido nucleico refere-se a uma *extremidade* da fita, não a orientação da ligação fosfodiéster individual ligando seus nucleotídeos constituintes. ■

O esqueleto covalente do DNA e do RNA está sujeito a hidrólise lenta e não enzimática das ligações fosfodiéster. No tubo de ensaio, o RNA é hidrolisado rapidamente em condições alcalinas, mas não o DNA; os grupamentos 2'-hidroxila no RNA (ausentes no DNA) estão diretamente envolvidos nesse processo. Os nucleotídeos 2',3'-monofosfato cíclicos são os primeiros produtos da ação de álcalis sobre o RNA e são rapidamente hidrolisados para gerar uma mistura de 2' e 3'-nucleosídeos monofosfato (Figura 8-8).

As sequências nucleotídicas dos ácidos nucleicos podem ser representadas esquematicamente, como ilustrado a seguir, por um segmento de DNA com cinco unidades nucleotídicas. Os grupos fosfato são simbolizados pelo P , e

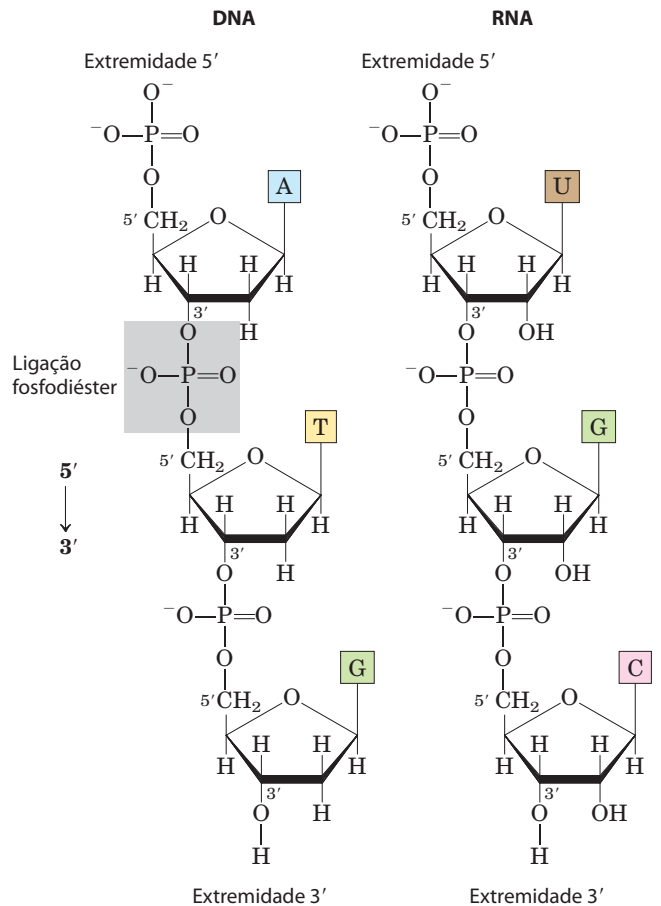


FIGURA 8-7 Ligações fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA e do RNA. As ligações fosfodiéster (uma das quais está sombreada no DNA) ligam unidades nucleotídicas sucessivas. O esqueleto de pentose e grupamentos fosfato alternados nos dois tipos de ácidos nucleicos é altamente polar. As extremidades 5' e 3' da macromolécula podem estar livres ou podem estar ligadas a um grupo fosforil.

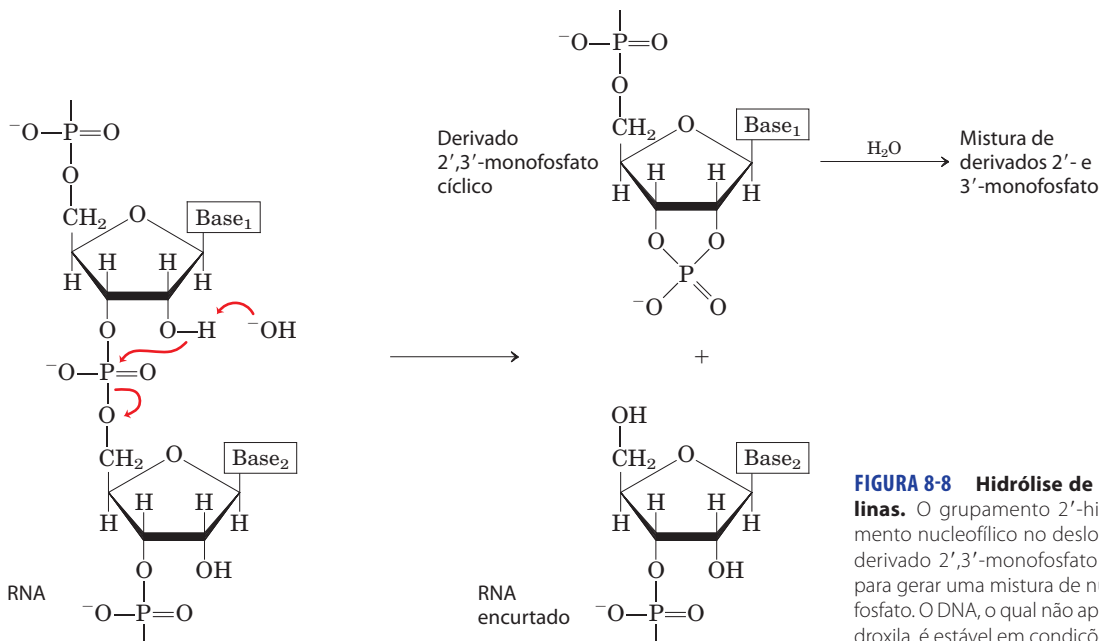
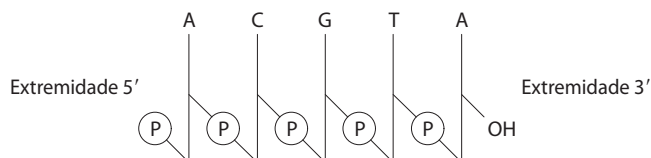


FIGURA 8-8 Hidrólise de RNA em condições alcalinas. O grupamento 2'-hidroxila atua como grupo nucleofílico no deslocamento intramolecular. O derivado 2',3'-monofosfato cíclico é mais hidrolisado para gerar uma mistura de nucleosídeos 2'- e 3'-monofosfato. O DNA, o qual não apresenta grupamentos 2'-hidroxila, é estável em condições semelhantes.

cada desoxirribose é simbolizada por uma linha vertical, a partir do C-1' na parte superior para o C-5' na parte inferior (mas lembre-se de que, nos ácidos nucleicos, o açúcar está sempre na sua forma de anel fechado de β -furanose). As linhas de conexão entre os nucleotídeos (as quais passam pelo P) estão desenhadas diagonalmente a partir do centro (C-3') da desoxirribose de um nucleotídeo para a parte inferior (C-5') do próximo nucleotídeo.



Algumas representações mais simples desse pentadesoxirribonucleotídeo são pA-C-G-T-A_{OH}, pApCpGpTpA e pACGTA.

CONVENÇÃO-CHAVE: A sequência de uma fita simples de ácido nucleico é sempre escrita com a sua extremidade 5' à esquerda e com a extremidade 3' à direita – isto é, na direção 5'→3'. ■

Um ácido nucleico pequeno é denominado **oligonucleotídeo**. A definição de “pequeno” é um tanto arbitrária, mas polímeros contendo 50 nucleotídeos ou menos em geral são chamados de oligonucleotídeos. Um ácido nucleico maior é chamado de **polinucleotídeo**.

As propriedades das bases nucleotídicas afetam a estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos

Purinas e pirimidinas livres são compostos fracamente básicos e, por isso, são chamados de bases. As purinas e as pirimidinas comuns no DNA e no RNA são moléculas aromáticas (Figura 8-2), uma propriedade com consequências importantes para a estrutura, a distribuição dos elétrons e a absorção de luz dos ácidos nucleicos. O deslocamento dos elétrons entre os átomos no anel confere à maioria das ligações caráter parcial de ligação dupla. O resultado é que as pirimidinas são moléculas planares e as purinas são muito próximas a uma estrutura planar, com

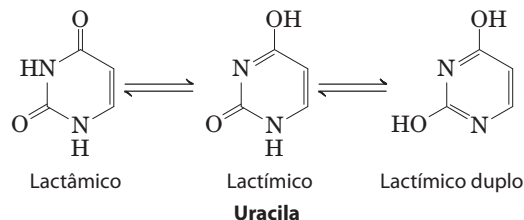


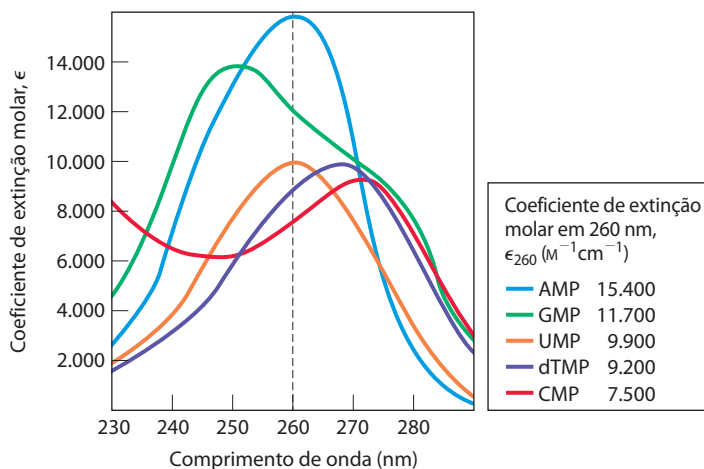
FIGURA 8-9 Formas tautoméricas da uracila. A forma lactâmica predomina em pH 7,0; as outras formas tornam-se mais proeminentes quando o pH diminui. As outras pirimidinas livres e as purinas livres também têm formas tautoméricas, mas são mais raramente encontradas.

uma leve prega. Bases púricas e pirimídicas livres podem existir em duas ou mais formas tautoméricas, dependendo do pH. A uracila, por exemplo, ocorre nas formas lactâmicas, lactímicas e lactímicas duplas (Figura 8-9). As estruturas mostradas na Figura 8-2 são os tautômeros que predominam em pH 7,0. Todas as bases nucleotídicas absorvem luz UV, e os ácidos nucleicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximos a 260 nm (Figura 8-10).

As bases púricas e pirimídicas são hidrofóbicas e relativamente insolúveis em água perto do pH neutro da célula. Em pH ácido ou alcalino, as bases tornam-se carregadas e sua solubilidade em água aumenta. Interações de empilhamento hidrofóbicas em que duas ou mais bases são posicionadas com os planos de seus anéis em paralelo (como pilha de moedas) são uma das duas formas mais importantes de interação entre bases nos ácidos nucleicos. O empilhamento também envolve a combinação de interações dipolo-dipolo e de van der Waals entre as bases. O empilhamento de bases ajuda a minimizar o contato das bases com a água e interações de empilhamento de bases são muito importantes na estabilização da estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos, como descrito posteriormente.

Os grupos funcionais das purinas e das pirimidinas são anéis nitrogenados, grupos carbonila e grupos amino exocíclicos. As ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amino e carbonila são a forma mais importante de interação entre duas (e ocasionalmente três ou quatro) cadeias com-

FIGURA 8-10 Espectro de absorção dos nucleotídeos comuns. Os espectros são mostrados de acordo com a variação nos coeficientes de extinção molar pelo comprimento de onda. Os coeficientes de extinção molar em 260 nm e pH 7,0 (ϵ_{260}) estão listados na tabela. Os espectros dos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos correspondentes, assim como os nucleosídeos, são essencialmente idênticos. Para misturas de nucleotídeos, o comprimento de onda de 260 nm (linha vertical tracejada) é usado para medidas de absorção.



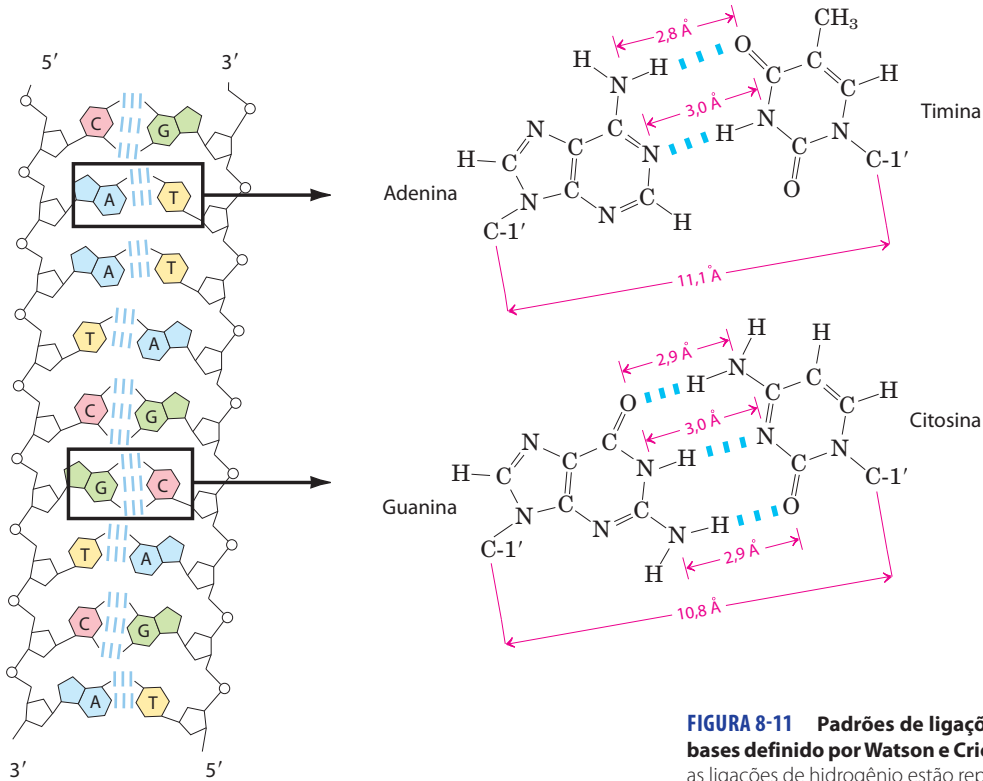


FIGURA 8-11 Padrões de ligações de hidrogênio no pareamento de bases definido por Watson e Crick. Aqui, como em outras partes no livro, as ligações de hidrogênio estão representadas por três linhas azuis.

plementares de ácidos nucleicos. Os padrões mais comuns de ligações de hidrogênio são aqueles definidos por James D. Watson e Francis Crick em 1953, nos quais A liga-se especificamente a T (ou U) e G liga-se a C (Figura 8-11). Esses dois tipos de pares de bases predominam no DNA de fita dupla e no RNA e os tautômeros mostrados na Figura 8-2 são responsáveis por esses padrões. É esse pareamento específico de bases que permite a duplicação da informação genética, como será discutido posteriormente neste capítulo.

o grupo 5'-hidroxila de uma pentose e o grupo 3'-hidroxila da próxima pentose.

- ▶ Existem dois tipos de ácidos nucleicos: RNA e DNA. Os nucleotídeos no RNA contêm ribose e as bases pirimídicas comuns são a uracila e a citosina. No DNA, os nucleotídeos contêm 2'-desoxirribose e as bases pirimídicas comuns são a timina e a citosina. As purinas primárias são adenina e guanina tanto no RNA quanto no DNA.



James D. Watson



Francis Crick, 1916-2004

RESUMO 8.1 Alguns dados básicos

- ▶ Um nucleotídeo é constituído por uma base nitrogenada (purina ou pirimidina), um açúcar pentose e um ou mais grupos fosfato. Os ácidos nucleicos são polímeros de nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster entre

8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos

A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 deu origem a disciplinas completamente novas e influenciou o rumo de muitas já estabelecidas. Nesta seção, o foco principal será a estrutura do DNA, alguns dos eventos que conduziram para a sua descoberta e aprimoramentos mais recentes na nossa compreensão do DNA. A estrutura do RNA também é apresentada.

Como no caso da estrutura proteica (Capítulo 4), muitas vezes é útil descrever a estrutura de ácidos nucleicos em termos de níveis de complexidade hierárquicos (primário, secundário, terciário). A estrutura primária dos ácidos nucleicos é sua estrutura covalente e sequência nucleotídica. Qualquer estrutura regular e estável adotada por alguns ou todos os nucleotídeos em um ácido nucleico pode ser considerada como estrutura secundária. Todas as estruturas consideradas no restante deste capítulo se classificam como estruturas secundárias. O enovelamento complexo de grandes cromossomos dentro da cromatina eucariótica e o nucleóide bacteriano ou o elaborado enovelamento de

grandes moléculas de tRNA ou rRNA geralmente são considerados estruturas terciárias. A estrutura terciária do DNA é discutida no Capítulo 24 e a estrutura terciária do RNA é considerada no Capítulo 26.

O DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética

O DNA foi inicialmente isolado e caracterizado por Friedrich Miescher em 1868. Ele chamou a substância contendo fósforo de “nucleína”. Até os anos de 1940, com o trabalho de Oswald T. Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty, não existia uma evidência convincente de que o DNA fosse o material genético. Avery e seus colegas descobriram que DNA extraído de uma linhagem virulenta (patogênica) da bactéria *Streptococcus pneumoniae* e injetado em uma linhagem não virulenta da mesma bactéria transformava a linhagem não virulenta em virulenta. Eles concluíram que o DNA da linhagem virulenta carregava a informação genética para virulência. Então, em 1952, experimentos de Alfred D. Hershey e Martha Chase, que estudaram a infecção de células bacterianas por um vírus (bacteriófago), com DNA ou proteína marcados radioativamente, acabaram qualquer dúvida remanescente de que o DNA, e não a proteína, portava a informação genética.

Outra pista importante para a estrutura do DNA veio do trabalho de Erwin Chargaff e seus colegas no final dos anos de 1940. Eles descobriram que as quatro bases nucleotídicas do DNA eram encontradas em proporções diferentes nos DNAs de organismos diferentes e que as quantidades de certas bases estavam relacionadas. Esses dados, coletados a partir de DNAs de uma variedade muito grande de espécies, conduziram Chargaff às seguintes conclusões:

1. A composição de bases do DNA, em geral, varia de uma espécie para a outra.
2. Amostras de DNA isoladas de diferentes tecidos da mesma espécie têm a mesma composição de bases.
3. A composição de bases de DNA em uma dada espécie não muda com a idade do organismo, seu estado nutricional ou a mudança de ambiente.
4. Em todos os DNAs celulares, independentemente da espécie, o número de resíduos da adenosina é igual ao número de resíduos da timidina (isto é, $A = T$) e o número de resíduos de guanina é igual ao número de resíduos de citidina ($G = C$). Dessas correlações, conclui-se que a soma dos resíduos de purina é igual à soma dos resíduos de pirimidina; isto é, $A + G = T + C$.

Essas relações quantitativas, algumas vezes denominadas “regras de Chargaff”, foram confirmadas por muitos outros pesquisadores. Elas foram a chave para estabelecer a estrutura tridimensional do DNA e para levantar pistas da forma como a informação genética está codificada no DNA e é transmitida de uma geração para a outra.

Para esclarecer melhor sobre a estrutura do DNA, Rosalind Franklin e Maurice Wilkins usaram o método eficaz da difração por raios X (ver Quadro 4-5) para analisar fibras de DNA. Eles demonstraram, no início dos anos de 1950, que o DNA produz um padrão de difração por raios X característi-

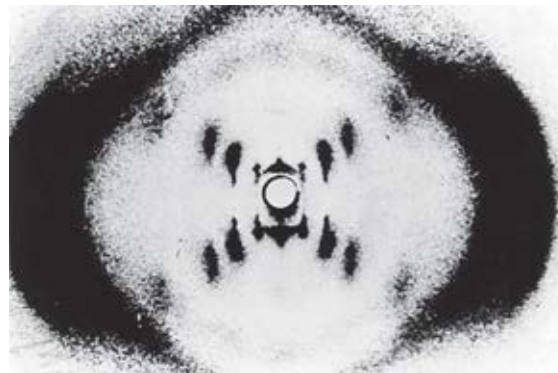


FIGURA 8-12 Padrão de difração por raios X de fibras do DNA. As marcas formando uma cruz no centro demonstram a estrutura helicoidal. As bandas pesadas na esquerda e na direita originam-se das bases recorrentes.

co (Figura 8-12). A partir desse padrão, deduziu-se que as moléculas de DNA são helicoidais com duas periodicidades ao longo de seu eixo mais longo, a primária de 3,4 Å e a secundária de 34 Å. O problema então era propor o modelo tridimensional de uma molécula de DNA que pudesse ser compatível não apenas com os dados de difração de raios X, mas também com a equivalência de bases $A=T$ e $G=C$ específica descoberta por Chargaff e com as outras propriedades químicas do DNA.



Rosalind Franklin,
1920-1958



Maurice Wilkins,
1916-2004

James Watson e Francis Crick contaram com essas informações acumuladas sobre o DNA para deduzir sua estrutura. Em 1953, eles postularam o modelo tridimensional da estrutura do DNA que levava em consideração todos os dados disponíveis. O modelo consiste em duas cadeias de DNA helicoidais enroladas em torno do mesmo eixo para formar uma dupla-hélice de orientação à direita (ver no Quadro 4-1 uma explicação sobre a orientação à direita e à esquerda da estrutura helicoidal). Os esqueletos hidrofílicos de grupos fosfato e desoxirribose alternados estão no lado de fora da dupla-hélice, orientados para a água circundante. O anel furanosídico de cada desoxirribose está na conformação C-2' endo. As bases pirimídicas e púricas das duas fitas estão empilhadas dentro da dupla-hélice, com suas estruturas hidrofóbicas em forma de anel e quase planares muito perto uma da outra e perpendiculares ao eixo longitudinal. O pareamento perfeito das duas fitas cria um **sulco maior** e um

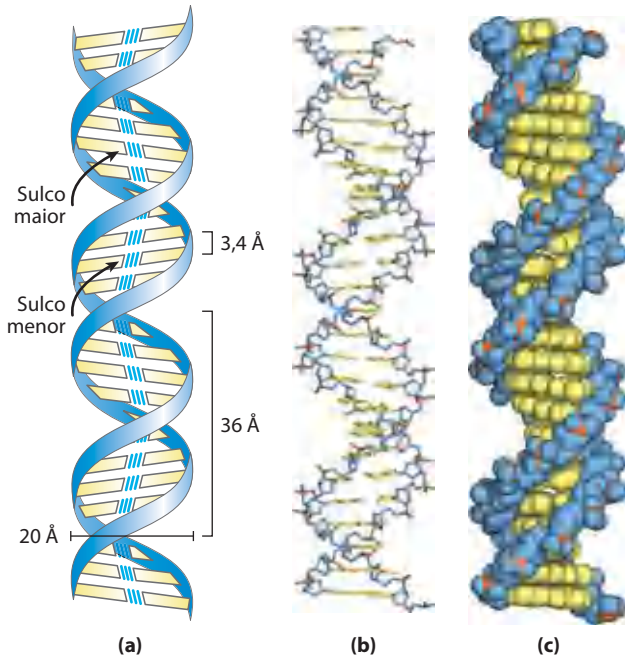


FIGURA 8-13 Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA. O modelo original proposto por Watson e Crick tinha 10 pares de bases ou 34 Å (3,4 nm) por volta da hélice; medidas subsequentes revelaram 10,5 pares de bases ou 36 Å (3,6 nm) por volta. **(a)** Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice. **(b)** Representação em bastão mostrando o esqueleto e o empilhamento de bases. **(c)** Modelo de volume atômico.

sulco menor na superfície do duplex (**Figura 8-13**). Cada base nucleotídica de uma fita está pareada no mesmo plano com a base da outra fita. Watson e Crick descobriram que os pares de bases unidos por ligações de hidrogênio de G com C e de A com T, mostrados na **Figura 8-11**, são aqueles que melhor se enquadram dentro da estrutura, fornecendo uma base lógica para a regra de Chargaff que, em qualquer DNA, $G = C$ e $A = T$. É importante notar que podem ser formadas três ligações de hidrogênio entre G e C, simbolizadas $G \equiv C$, mas apenas duas podem ser formadas entre A e T, simbolizadas $A = T$. Essa é uma razão para a descoberta de que a separação das fitas pareadas do DNA é mais difícil quanto maior for a razão do pareamento de bases $G \equiv C$ para $A = T$. Outros pareamentos de bases tendem (em vários graus) a desestabilizar a estrutura dupla helicoidal.

Quando Watson e Crick construíram seu modelo, eles tiveram que decidir inicialmente se as fitas de DNA seriam **paralelas** ou **antiparalelas** – se suas ligações fosfodiéster 3',5' iriam seguir no mesmo sentido ou em sentidos opostos. Uma orientação antiparalela produziu o modelo mais convincente e trabalhos posteriores com DNA-polimerases (Capítulo 25) produziram evidências experimentais de que as fitas eram mesmo antiparalelas, um achado confirmado posteriormente por análise de raios X.

Para explicar a periodicidade nos padrões de difração de raios X das fibras de DNA, Watson e Crick manipularam modelos moleculares para chegar à estrutura em que a distância entre as bases empilhadas verticalmente no interior da dupla-hélice seria de 3,4 Å; uma distância de repetição secundária de aproximadamente 34 Å foi atribuída para a

presença de 10 pares de bases em cada volta completa da dupla-hélice. Em solução aquosa, a estrutura é um pouco diferente daquela nas fibras, havendo 10,5 pares de bases por volta helicoidal (**Figura 8-13**).

Como mostra a **Figura 8-14**, as duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas da dupla-hélice de DNA não são idênticas nem na sua sequência de bases e nem na sua composição. Elas são **complementares** entre si. Sempre que a adenina está presente em uma cadeia, a timina é encontrada na outra; da mesma forma, sempre que a guanina está presente em uma cadeia, a citosina é encontrada na outra.

A dupla-hélice de DNA, ou duplex, é mantida por duas forças, como descrito anteriormente: ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares (**Figura 8-11**) e interações de empilhamento de bases. A complementaridade entre as cadeias de DNA é atribuída à ligação de hidrogênio entre os pares de bases. As interações de empilhamento de bases, as quais são muito inespecíficas no que diz respeito à identidade das bases empilhadas, determinam a maior contribuição para a estabilidade da dupla-hélice.

Os aspectos importantes do modelo da dupla-hélice da estrutura do DNA são mantidos, em grande parte, por evidências biológicas e químicas. Além disso, o modelo sugere imediatamente um mecanismo para a transmissão da informação genética. O aspecto principal do modelo é a complementaridade das duas cadeias de DNA. Como Watson e Crick foram capazes de visualizar, muito antes da disponibilidade de dados confirmatórios, essa estrutura poderia ser replicada de forma lógica pela (1) separação das duas cadeias e (2) síntese de uma cadeia complementar a cada uma delas. Uma vez que, em cada nova cadeia, os nucleotídeos são unidos na sequência especificada pelas regras de pareamento de bases descritas anteriormente, cada cadeia preexistente funciona

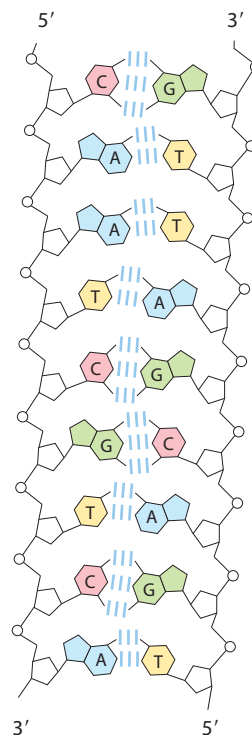


FIGURA 8-14 Complementaridade das cadeias na dupla-hélice de DNA. As cadeias antiparalelas complementares do DNA seguem as regras propostas por Watson e Crick. As cadeias antiparalelas pareadas por bases são diferentes na sua composição de bases: a cadeia da esquerda tem a composição $A_3T_2G_1C_3$; a da direita, $A_2T_3G_3C_1$. Elas também se diferenciam na sequência quando cada cadeia é lida na direção 5' → 3'. Observe as equivalências de bases: $A = T$ e $G = C$ no duplex.

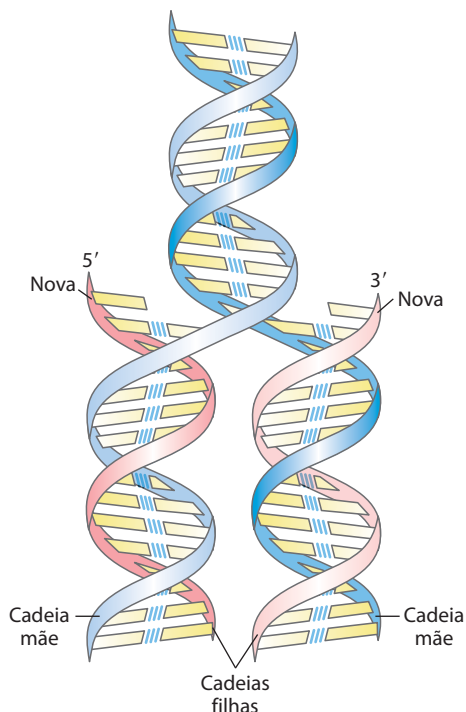


FIGURA 8-15 Replicação do DNA como sugerido por Watson e Crick. As "cadeias mãe" ou preexistentes são separadas e cada uma é o molde para a biossíntese de uma "cadeia filha" complementar (em cor-de-rosa).

como molde para direcionar a síntese de uma cadeia complementar (**Figura 8-15**). Essas suposições foram confirmadas experimentalmente, inaugurando uma revolução na nossa compreensão da hereditariedade biológica.

Término leitura básica

PROBLEMA RESOLVIDO 8-1 Pareamento de bases no DNA

Em amostras de DNA isoladas de duas espécies de bactérias não identificadas, X e Y, adenina constitui 32 e 17%, respectivamente, do total de bases. Que proporção relativa de adenina, guanina, timina e citosina você esperaria encontrar nas duas amostras de DNA? Que suposições você fez? Uma dessas espécies foi isolada de uma fonte de água quente (64°C). Qual espécie é a mais provável de ser uma bactéria termofílica e por quê?

Solução: Para qualquer dupla-hélice de DNA, $A = T$ e $G = C$. O DNA da espécie X tem 32% de A e, portanto, deve conter 32% de T. Isso totaliza 64% das bases e deixa 36% para pareamento $G \equiv C$: 18% de G e 18% de C. A amostra da espécie Y, com 17% de A, deve conter 17% de T, totalizando 34% dos pares de bases. Os 66% restantes de bases são então distribuídos igualmente assumindo que ambas as moléculas de DNA estão na forma de dupla-hélice.

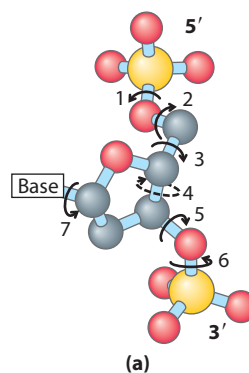
Quanto maior o conteúdo $G + C$ da molécula de DNA, maior é a temperatura de fusão. A espécie Y, como apresentada o DNA com o maior conteúdo $G + C$ (66%), é a bactéria termofílica mais provável; seu DNA tem a maior temperatura de fusão e, portanto, é mais estável na temperatura da fonte de água quente.

Início leitura avançada

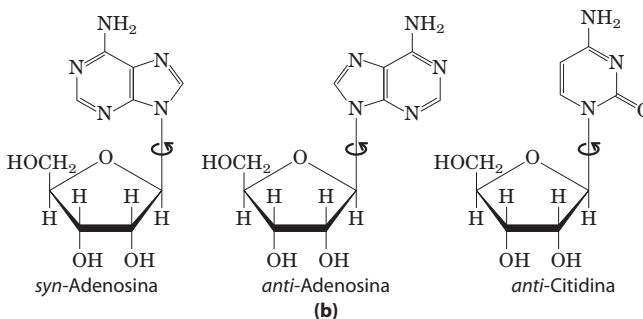
O DNA pode ocorrer em formas tridimensionais diferentes

O DNA é uma molécula extremamente flexível. Rotação considerável é possível em torno de vários tipos de ligações no esqueleto açúcar-fosfato (fosfodesoxirribose) e flutuação térmica pode produzir enovelamento, alongamento e desnaturação (fusão) das cadeias. Muitas variações significativas da estrutura de DNA de Watson e Crick são encontradas no DNA celular, algumas ou todas elas podem ser importantes no metabolismo de DNA. Essas variações estruturais geralmente não afetam as propriedades-chave do DNA descritas por Watson e Crick: complementaridade das cadeias, cadeias antiparalelas e a exigência do pareamento $A \equiv T$ e $G \equiv C$.

Variação estrutural no DNA reflete três aspectos: as diferentes conformações possíveis da desoxirribose, a rotação em torno das ligações contíguas que constituem o esqueleto de fosfodesoxirribose (**Figura 8-16a**) e a rotação livre em torno da ligação C-1'-N-glicosídica (**Figura 8-16b**). Devido a restrições estéricas, as purinas nos nucleotídeos púricos estão restritas a duas conformações estáveis com respeito à desoxirribose, denominadas *syn* e *anti* (**Figura 8-16b**). As pirimidinas geralmente estão restritas à conformação *anti*, devido a interferências estéricas entre o açúcar e o oxigênio da carbonila no C-2 da pirimidina.



(a)



(b)

FIGURA 8-16 Variação estrutural no DNA. (a) A conformação de um nucleotídeo no DNA é afetada pela rotação de aproximadamente sete ligações diferentes. Seis dessas ligações giram livremente. Uma rotação limitada da ligação 4 origina uma dobra no anel. Essa conformação é endo ou exo, dependendo se o átomo encontra-se no mesmo lado do plano como C-5' ou no lado oposto (ver **Figura 8-3b**). (b) Para bases púricas nos nucleotídeos, apenas duas conformações relacionadas às unidades de ribose ligadas são permitidas estericamente, *anti* ou *syn*. As pirimidinas ocorrem na conformação *anti*.

A estrutura de Watson e Crick também é conhecida como **forma B do DNA** ou B-DNA. A forma B é a estrutura mais estável para uma molécula de DNA de sequência aleatória sob condições fisiológicas, sendo, desta forma, o ponto de referência padrão em qualquer estudo das propriedades do DNA. Duas variantes estruturais que tiveram suas estruturas cristalográficas bem caracterizadas são as **formas A e Z**. Essas três conformações de DNA estão mostradas na **Figura 8-17**, com um resumo das suas propriedades. A forma A é favorecida em muitas soluções que são relativamente livres de água. O DNA é ainda organizado na forma de dupla-hélice à direita, mas a hélice é mais larga e o número de bases por volta helicoidal é 11, em vez de 10,5 como no B-DNA. O plano dos pares de bases no A-DNA está inclinado em cerca de 20° relativo aos pares de bases do B-DNA, então os pares de bases no A-DNA não estão perfeitamente perpendiculares ao eixo da hélice. Essas mudanças estruturais aprofundam o sulco maior enquanto fazem o sulco menor mais superficial. Os reagentes usados para promover cristalização de DNA tendem a desidratá-lo, e assim a maioria das moléculas de DNA pequenas tende a cristalizar na forma A.

A forma Z do DNA é um afastamento mais radical da estrutura B; a diferença mais óbvia é a rotação helicoidal à esquerda. Nessa forma são encontrados 12 pares de bases por volta helicoidal, e a estrutura aparece mais delgada e alongada. O esqueleto de DNA adquire uma aparência de ziguezague. Certas sequências nucleotídicas dobram em hélices Z à esquerda muito mais facilmente que outras. Exemplos eminentes são sequências em que pirimidinas

alternam com purinas, especialmente alternando resíduos de C e G ou 5-metil-C e G. Para formar a hélice à esquerda no Z-DNA, os resíduos púricos mudam para a conformação *syn*, alternando com pirimidinas na conformação *anti*. O sulco maior é pouco aparente no Z-DNA, e o o sulco menor é estreito e profundo.

A ocorrência do A-DNA em células é duvidosa, mas existem evidências para algumas pequenas extensões (trechos) do Z-DNA em bactérias e em eucariotos. Esses trechos de Z-DNA podem ter um papel (até agora não definido) na regulação da expressão de alguns genes ou em recombinação genética.

Certas sequências de DNA adotam estruturas incomuns

Outras variações estruturais dependentes de sequência encontradas em cromossomos grandes podem afetar a função e o metabolismo dos segmentos de DNA em suas adjacências. Por exemplo, ocorrem curvaturas na hélice de DNA sempre que quatro ou mais resíduos de adenosina aparecem sucessivamente em uma cadeia. Seis adenosinas, uma após a outra, produzem uma curvatura de cerca de 18°. A curvatura observada nessa e em outras sequências pode ser importante na ligação de algumas proteínas ao DNA.

Um tipo de sequência de DNA bem comum é um **palíndromo**. Um palíndromo é uma palavra ou frase escrita de forma idêntica se for lida da esquerda para a direita ou vice-versa; dois exemplos são OMISSÍSSIMO e LUZ AZUL. O termo é aplicado a regiões de DNA com **repetições invertidas** de sequências de bases tendo simetria dupla

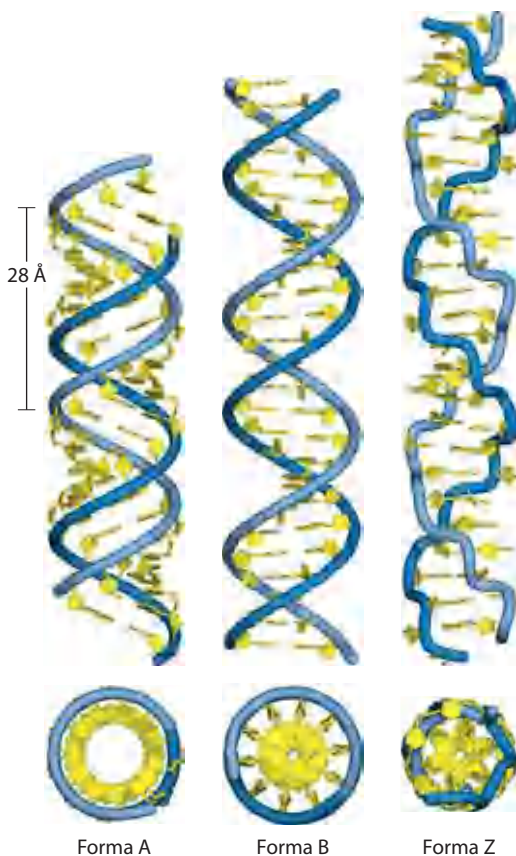


FIGURA 8-17 Comparação das formas A, B e Z do DNA. Cada estrutura mostrada aqui tem 36 pares de bases. As riboses e as bases estão em amarelo. O esqueleto fosfodiéster está representado como uma corda azul. Azul é a cor usada para representar cadeias de DNA nos capítulos seguintes. A tabela resume algumas propriedades das três formas do DNA.

	Forma A	Forma B	Forma C
Orientação da hélice	À direita	À direita	À esquerda
Diâmetro	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Pares de bases por volta helicoidal	11	10,5	12
Incremento na hélice por par de bases	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Torção da hélice por volta helicoidal	20°	6°	7°
Conformação do anel de ribose	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo em pirimidinas; C-3' endo em purinas
Conformação da ligação glicosídica	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>	<i>Anti</i> em pirimidinas; <i>syn</i> em purinas

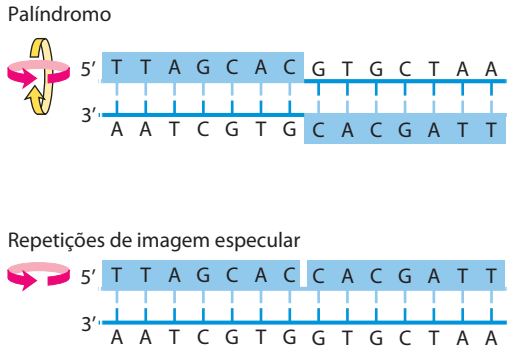


FIGURA 8-18 Palíndromos e repetições de imagem especular. Palíndromos são seqüências de ácidos nucleicos de fita dupla com simetria dupla. A fim de sobrepôr uma repetição (seqüência sombreada) na outra, ela deve ser girada 180° em torno do eixo horizontal e então 180° em torno do eixo vertical, como mostrado pelas setas coloridas. Uma repetição de imagem especular, por outro lado, tem uma seqüência simétrica dentro de cada cadeia. Sobrepor uma repetição na outra requer apenas uma única rotação de 180° em torno do eixo vertical.

nas duas cadeias de DNA (Figura 8-18). Tais seqüências são autocomplementares dentro de cada cadeia e, conseqüentemente, têm potencial para formar estruturas **cruciformes** (em formato de cruz) ou em **grupo** (Figura 8-19). Quando a repetição invertida ocorre dentro de cada cadeia individual de DNA, a seqüência é denominada **repetição de imagem especular**. As repetições de imagem especular não têm seqüências complementares dentro da mesma cadeia e não formam grupos ou estruturas cruciformes. Seqüências desses tipos são encontradas em praticamente cada grande molécula de DNA e podem abranger poucos pares de bases ou milhares. O número de palíndromos que ocorrem como cruciformes em células não é conhecido, embora algumas estruturas cruciformes tenham sido demonstradas *in vivo* em *Escherichia coli*. As seqüências autocomplementares produzem enovelamentos de cadeias simples de DNA (ou RNA) isoladas em solução para se dobrar em estruturas complexas contendo múltiplos grupos.

Algumas estruturas de DNA incomuns envolvem três ou até mesmo quatro cadeias de DNA. Os nucleotídeos participantes de um par de bases do tipo Watson-Crick (Figura 8-11) podem formar ligações de hidrogênio adicionais, especialmente com grupos funcionais ancorados no sulco maior. Por exemplo, um resíduo de citidina (se protonado) pode parear com o resíduo de guanina de um par nucleotídico G≡C (Figura 8-20); uma timidina pode parear com a adenosina de um par A=T. O N-7, o O⁶ e o N⁶ das purinas, os átomos que participam na ligação de hidrogênio do triplex de DNA frequentemente são denominados **posições de Hoogsteen**, e o pareamento do tipo não Watson-Crick é chamado de **pareamento de Hoogsteen**, em homenagem a Karst Hoogsteen, que em 1963 reconheceu pela primeira vez o potencial desses pareamentos incomuns. O pareamento de Hoogsteen permite a formação de **triplex de DNA**. Os triplex mostrados na Figura 8-20 (a, b) são mais estáveis em pH baixo porque o trio C≡G · C⁺ requer uma citosina protonada. No triplex, o pK_a dessa citosina é > 7,5, diferente do seu valor normal de 4,2. Os triplex também se

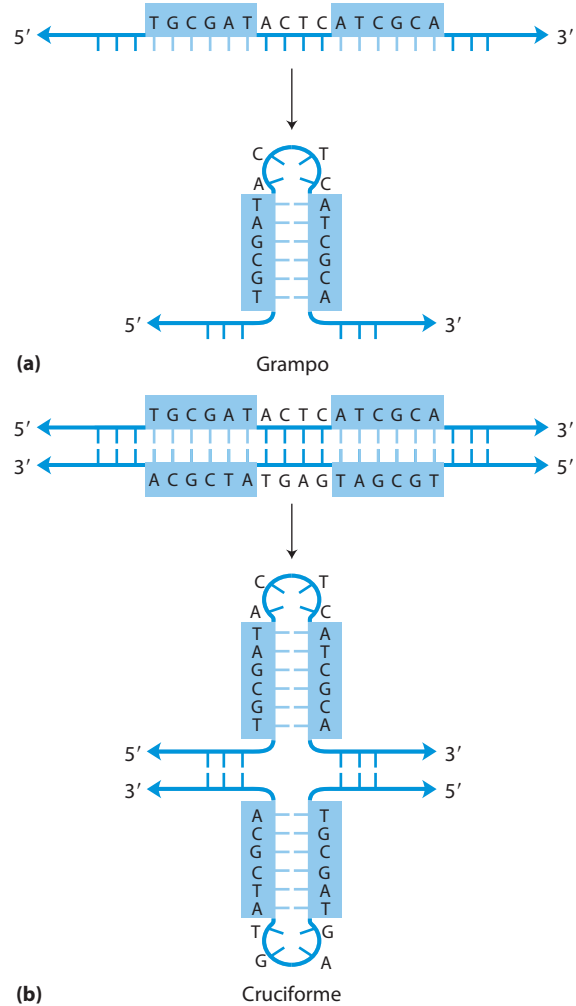


FIGURA 8-19 Grupos e estruturas cruciformes. Seqüências de DNA (ou RNA) palindrômicas podem formar estruturas alternativas com pareamento de bases intracadeia. (a) Quando somente uma única cadeia de DNA (ou RNA) está envolvida, a estrutura é chamada de grupo. (b) Quando ambas as cadeias do duplex de DNA estão envolvidas, a estrutura é denominada cruciforme. O sombreado azulado realça seqüências assimétricas que podem parear com seqüências complementares tanto na mesma cadeia quanto na cadeia complementar.

formam mais facilmente em seqüências longas contendo somente pirimidinas ou somente purinas em uma dada cadeia. Alguns triplex de DNA contêm duas cadeias púricas e uma cadeia pirimídica; outros contêm duas cadeias púricas e uma cadeia pirimídica.

Quatro cadeias de DNA também podem parear para formar um tetraplex (quadruplex), mas isso ocorre facilmente apenas para seqüências de DNA com uma proporção muito alta de resíduos de guanosina (Figura 8-20c, d). O tetraplex da guanosina, ou **tetraplex G**, é bastante estável em uma faixa ampla de condições. A orientação das cadeias em um tetraplex pode variar como mostrado na Figura 8-20e.

No DNA de células vivas, sítios reconhecidos por muitas proteínas ligantes de DNA em seqüências específicas (Capítulo 28) estão organizados como palíndromos, e seqüências polipirimídicas ou polipúricas que podem formar hélices triplas são encontradas dentro de regiões envolvi-

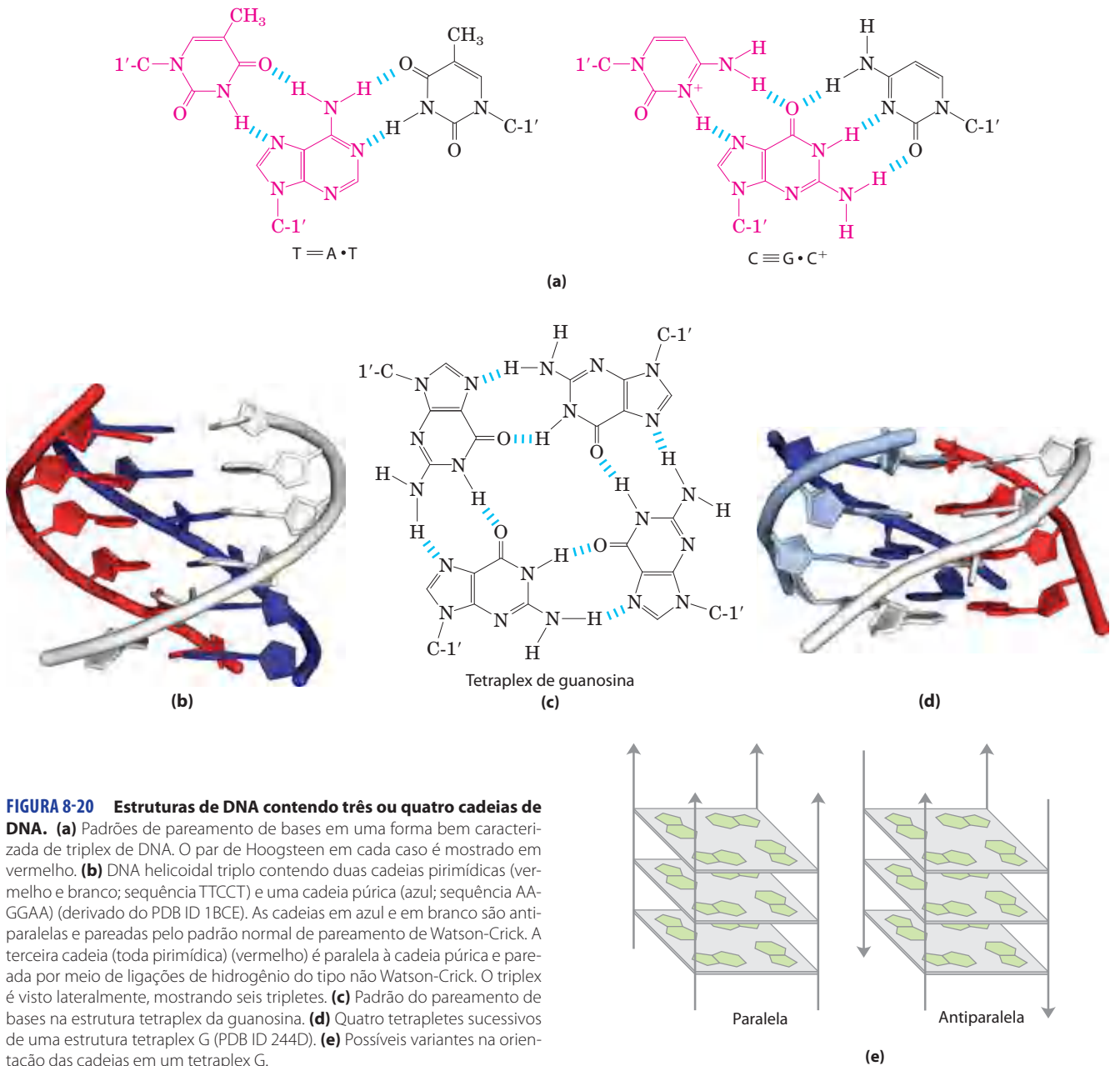


FIGURA 8-20 Estruturas de DNA contendo três ou quatro cadeias de DNA. (a) Padrões de pareamento de bases em uma forma bem caracterizada de triplex de DNA. O par de Hoogsteen em cada caso é mostrado em vermelho. (b) DNA helicoidal triplex contendo duas cadeias pirimídicas (vermelho e branco; seqüência TTCCT) e uma cadeia púrica (azul; seqüência AAGGAA) (derivado do PDB ID 1BCE). As cadeias em azul e em branco são anti-paralelas e pareadas pelo padrão normal de pareamento de Watson-Crick. A terceira cadeia (toda pirimídica) (vermelho) é paralela à cadeia púrica e pareada por meio de ligações de hidrogênio do tipo não Watson-Crick. O triplex é visto lateralmente, mostrando seis tripletes. (c) Padrão do pareamento de bases na estrutura tetraplex da guanósina. (d) Quatro tetrapletes sucessivos de uma estrutura tetraplex G (PDB ID 244D). (e) Possíveis variantes na orientação das cadeias em um tetraplex G.

das na regulação de expressão de alguns genes eucarióticos. A princípio, cadeias de DNA sintéticas desenhadas para parear com essas seqüências para formar triplex de DNA podem interromper a expressão gênica. Essa abordagem para controlar o metabolismo celular é de interesse comercial pela sua potencial aplicação na medicina e na agricultura. **Término leitura avançada**

RNAs mensageiros codificam para cadeias polipeptídicas

Agora o foco será a expressão da informação genética que o DNA contém. O RNA, a segunda maior forma de ácidos nucleicos nas células, tem muitas funções. Na expressão gênica, o RNA atua como intermediário pelo uso da informação codificada no DNA para especificar a seqüência de aminoácidos da proteína funcional. **Início leitura básica**

Uma vez que o DNA de eucariotos é basicamente confinado no núcleo, enquanto a síntese proteica ocorre nos ribossomos no citoplasma, alguma outra molécula que não o DNA deve carregar a mensagem genética do núcleo para o citoplasma. Já por volta da década de 1950, o RNA foi considerado o candidato lógico: o RNA é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma e um aumento na síntese proteica é acompanhado por um aumento na quantidade de RNA citoplásmico e um aumento da sua taxa de renovação. Essas e outras observações levaram vários pesquisadores a sugerir que o RNA carrega a informação genética do DNA para a maquinaria biossintética proteica do ribossomo. Em 1961, François Jacob e Jacques Monod apresentaram uma descrição consistente (e essencialmente correta) de muitos aspectos desse processo. Eles propuseram o nome “RNA

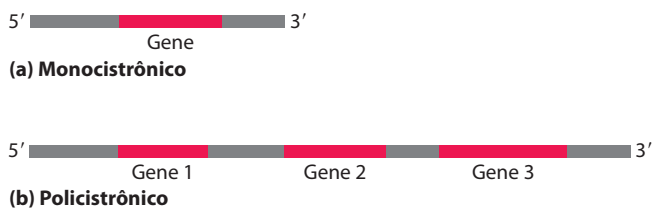


FIGURA 8-21 mRNA bacteriano. Diagrama esquemático mostrando mRNA (a) monocistrônico e (b) policistrônico de bactérias. Segmentos em vermelho representam RNA que codifica para um produto gênico; segmentos em cinza representam RNA não codificante. No transcrito policistrônico, o RNA não codificante separa os três genes.

mensageiro” (mRNA) para aquela porção do RNA celular total que carrega a informação genética do DNA para os ribossomos, onde os mensageiros fornecem os moldes que especificam as sequências de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas. Embora os mRNAs de diferentes genes possam variar muito em tamanho, os mRNAs de um gene em particular geralmente têm um tamanho definido. O processo de formação de um mRNA a partir de um molde de DNA é conhecido como **transcrição**.

Em bactérias e arqueobactérias, uma única molécula de mRNA pode codificar para uma ou várias cadeias polipeptídicas. Se ela carrega o código para somente um polipeptídeo, o mRNA é **monocistrônico**; se ela codifica para dois ou mais polipeptídeos diferentes, o mRNA é **policistrônico**. Em eucariotos, a maioria dos mRNAs é monocistrônica. (Para a finalidade dessa discussão, “cistron” refere-se a um gene. O termo por si só tem raízes históricas na ciência da genética e sua definição genética formal vai além do escopo deste texto.) O comprimento mínimo de um mRNA é determinado pelo comprimento da cadeia polipeptídica para a qual ele codifica. Por exemplo, uma cadeia polipeptídica de 100 resíduos de aminoácidos requer uma sequência codificante de RNA de pelo menos 300 nucleotídeos, porque cada aminoácido é codificado por um grupo de três nucleotídeos (este e outros detalhes de síntese proteica serão discutidos no Capítulo 27). Entretanto, mRNAs transcritos a partir de DNA são sempre um pouco mais longos que o comprimento necessário para a codificação simples de uma sequência (ou sequências) polipeptídica. A porção adicional não codificante do RNA inclui sequências que regulam a síntese proteica. A **Figura 8-21** resume a estrutura geral de mRNAs bacterianos.

Término leitura básica

Muitos RNAs têm estruturas tridimensionais mais complexas

Início leitura complementar

O RNA mensageiro é somente uma de várias classes de RNA celular. RNAs transportadores são moléculas adaptadoras na síntese proteica; ligadas covalentemente a um aminoácido em uma extremidade, elas pareiam com um mRNA de forma que os aminoácidos são unidos a um polipeptídeo crescente na sequência correta. RNAs ribossômicos são componentes dos ribossomos. Existe também uma grande variedade de RNA de função especial, incluindo alguns (chamados ribozimas) que têm atividade enzimática. Todos os RNAs serão considerados detalhadamente no Capítulo 26. As funções diversas e muitas vezes complexas desses

RNAs refletem a diversidade de uma estrutura muito mais rica do que a observada em moléculas de DNA.

O produto de transcrição do DNA é sempre RNA de fita simples. A cadeia simples tende a assumir a conformação helicoidal à direita dominada por interações de empilhamento de bases (**Figura 8-22**), as quais são mais fortes entre duas purinas do que entre uma purina e uma pirimidina ou entre duas pirimidinas. A interação purina-purina é tão forte que uma pirimidina separando duas purinas é muitas vezes deslocada do padrão de empilhamento, de forma que as purinas possam interagir. Qualquer sequência autocomplementar na molécula produz estruturas mais complexas. O RNA pode fazer pareamento de bases com regiões complementares de RNA ou de DNA. O pareamento de bases é igual ao padrão para DNA: G pareia com C e A pareia com U (ou com o ocasional resíduo de T em alguns RNA). Uma diferença é que o pareamento de bases entre resíduos de G e U – incomum no DNA – é permitido no RNA (ver Figura 8-24), quando sequências complementares nas duas cadeias simples de RNA pareiam uma com a outra. As cadeias pareadas no RNA ou nos duplex RNA-DNA são antiparalelas, como no DNA.

Quando duas cadeias de RNA com sequências perfeitamente complementares estão pareadas, a estrutura predominante de cadeia dupla é uma dupla-hélice de forma A à direita. As estruturas tridimensionais de muitos RNAs, como aquelas das proteínas, são complexas e únicas. Interações fracas, especialmente interações de empilhamento, ajudam a estabilizar as estruturas de RNA, assim como elas fazem no DNA. Hélices na forma Z foram feitas em laboratório (sob condições de alta salinidade e alta temperatura). A forma B do RNA ainda não foi observada. Quebras na hélice normal de forma A causadas pelo pareamento incorreto

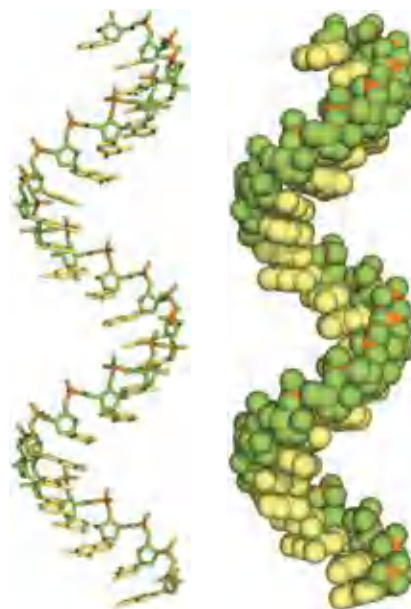


FIGURA 8-22 Padrão típico de empilhamento à direita de RNA de fita simples. As bases estão mostradas em amarelo, os átomos de fosfato em cor de laranja e as riboses e os oxigênios dos fosfatos em verde. Verde é usado para representar cadeias de RNA nos capítulos seguintes, assim como azul é usado para o DNA.

ou não pareamento de bases em uma ou ambas as cadeias são comuns e resultam em protuberâncias ou alças internas (Figura 8-23). Alças do tipo grampos formam-se entre seqüências autocomplementares (palindrômicas) vizinhas. O potencial para estruturas helicoidais de pareamento de bases em muitos RNAs é muito grande (Figura 8-24) e os grampos resultantes são o tipo mais comum de estrutura secundária no RNA. Seqüências de bases específicas pequenas (assim como UUCG) são muitas vezes encontradas no final de grampos de RNA e são conhecidas por formarem alças particularmente firmes e estáveis. Tais seqüências podem agir como pontos de partida para o enovelamento de uma molécula de RNA na sua estrutura tridimensional exata. Outras contribuições são feitas pelas ligações de hidrogênio que não fazem parte do pareamento de bases padrão do tipo Watson-Crick. Por exemplo, o grupo 2'-hidroxila da ribose pode formar ligações de hidrogênio com outros grupos. Algumas dessas propriedades são evidentes na estrutura do RNA transportador de fenilalanina de levedura – o tRNA responsável pela inserção de resíduos de Phe nos polipeptídeos – e em duas enzimas de RNA, ou ribozimas, cujas funções, assim como das enzimas proteicas, dependem das suas estruturas tridimensionais (Figura 8-25).

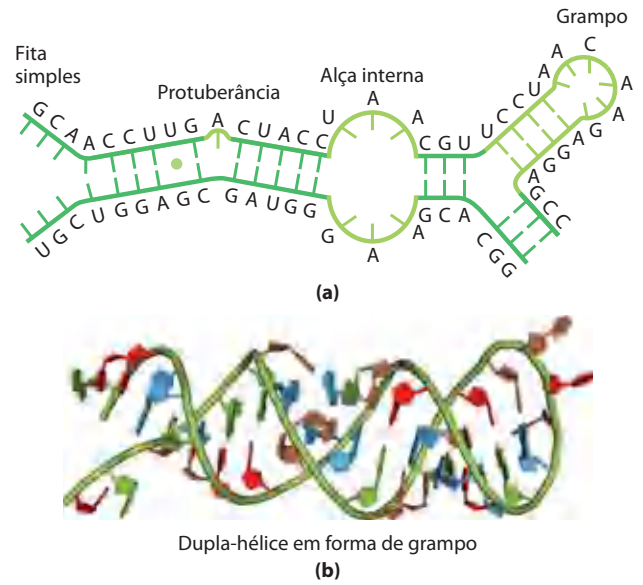
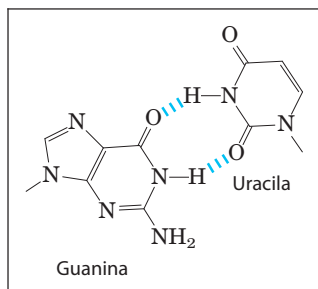


FIGURA 8-23 Estrutura secundária de RNA. (a) Protuberância, alça interna e grampo. (b) As regiões pareadas geralmente têm uma hélice direita na forma A, como mostrado no grampo (derivado do PDB ID 1GID).

FIGURA 8-24 Estruturas helicoidais de pareamento de bases no RNA. A possível estrutura secundária do componente RNA M1 da enzima RNase P de *E. coli*, com muitos grampos, está mostrada aqui. A RNase P, a qual também contém um componente proteico (não mostrado), funciona no processamento dos RNAs transportadores (ver Figura 26-26). Os dois colchetes indicam seqüências complementares adicionais que podem estar pareadas na estrutura tridimensional. Os pontos azuis indicam pares de bases G=U do tipo não Watson-Crick (inserção no quadro). Observe que pares de bases G=U são permitidos somente quando cadeias pré-sintetizadas de RNA se dobras ou se anelam umas com as outras. Não há RNA-polimerases (as enzimas que sintetizam RNA a partir de um molde de DNA) para inserir uma U tendo como molde uma G, ou vice-versa, durante a síntese de RNA.



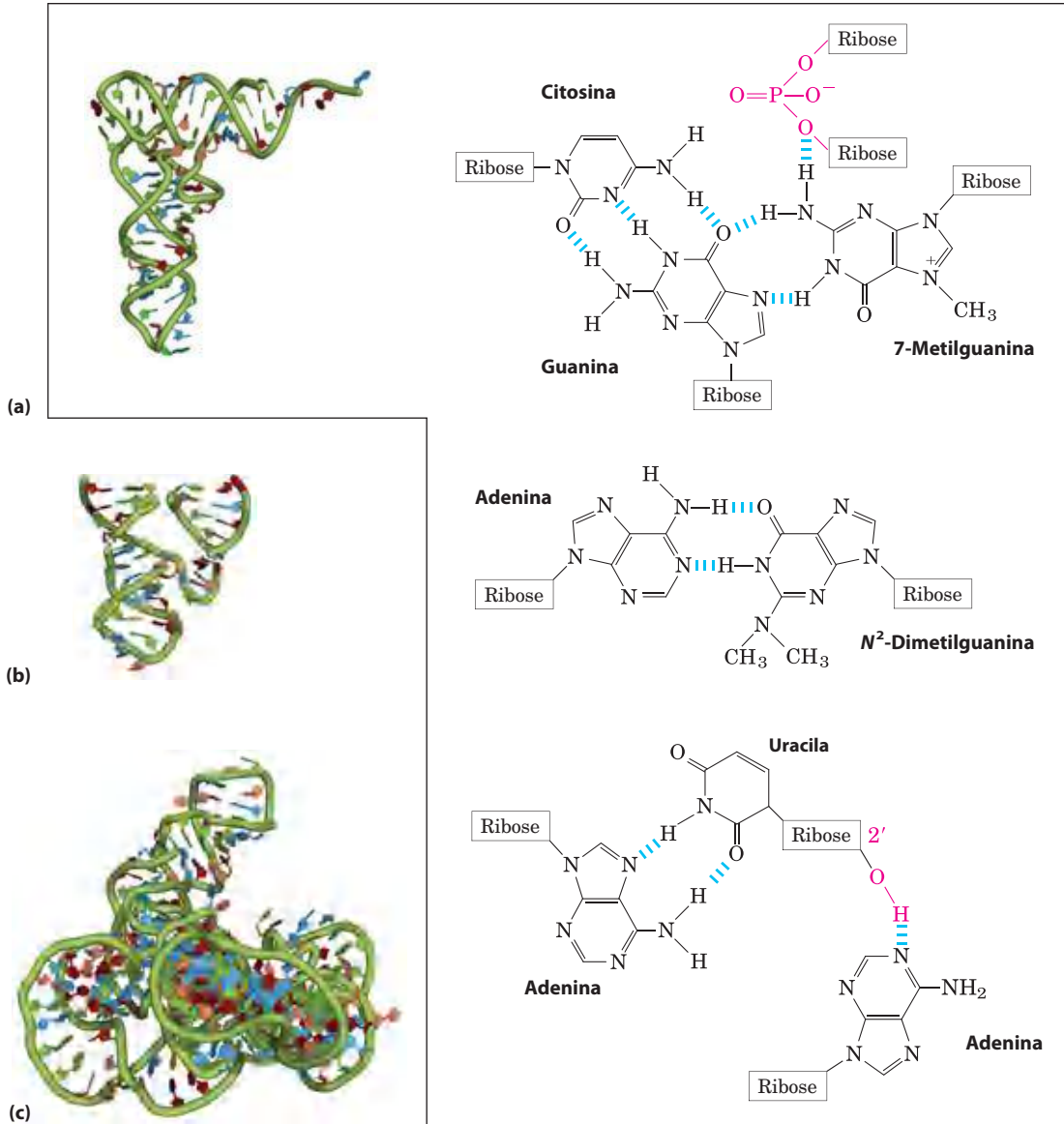


FIGURA 8-25 Estrutura tridimensional do RNA. (a) Estrutura tridimensional do tRNA de fenilalanina em levedura (PDB ID 1TRA). Alguns padrões de pareamento de bases incomuns encontrados neste tRNA estão mostrados. Observe também o envolvimento do oxigênio de uma ligação fosfodiéster da ribose em um arranjo de ligação de hidrogênio e um grupo 2'-hidroxila da ribose em outro (ambos em vermelho). (b) Ribozima cabeça-de-martelo (denominada desta forma devido à estrutura secundária no sítio ativo que parece a cabeça de um martelo), obtida de certos vírus de plantas (obtida

de PDB ID 1MME). Ribozimas, ou enzimas de RNA, catalisam uma variedade de reações, principalmente do metabolismo de RNA e na síntese proteica. As estruturas tridimensionais complexas desses RNAs refletem a complexidade inerente na catálise, como descrito para enzimas proteicas no Capítulo 6. (c) Segmento de mRNA conhecido como íntron, de um protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* (obtido do PDB ID 1GRZ). Esse íntron (uma ribozima) catalisa sua própria excisão do meio dos éxons em uma cadeia de mRNA (discutido no Capítulo 26).

Término leitura complementar

A análise da estrutura do RNA e a relação entre estrutura e função compõem um campo emergente de pesquisa com muitas das mesmas complexidades da análise de estrutura proteica. A importância da compreensão da estrutura do RNA cresce à medida que surgem mais informações sobre o grande número de papéis funcionais das moléculas de RNA.

RESUMO 8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos

► Muitas linhas de evidência demonstram que o DNA carrega a informação genética. Alguns dos primeiros indi-

cios vieram do experimento de Avery-MacLeod-McCarty, o qual demonstrou que o DNA isolado de uma linhagem bacteriana pode entrar em células de outra linhagem e transformá-las, dotando-as com algumas características hereditárias do doador. O experimento de Hershey-Chase demonstrou que o DNA de um vírus bacteriano, mas não a sua cobertura proteica, carrega a mensagem genética para a replicação do vírus na célula hospedeira.

► Reunindo todas as informações, Watson e Crick postularam que o DNA nativo é constituído por duas cadeias

antiparalelas em uma organização de dupla-hélice com orientação à direita. Pares de bases complementares, A=T e G=C, são formados por ligações de hidrogênio dentro da hélice. Os pares de bases são empilhados perpendicularmente ao longo do eixo da dupla-hélice, a uma distância de 3,4 Å, com 10,5 pares de bases por volta.

- ▶ O DNA pode existir em várias formas estruturais. Duas variações da forma de Watson-Crick, ou B-DNA, são A-DNA e Z-DNA. Algumas variações estruturais dependentes de sequência causam enovelamentos na molécula de DNA. As cadeias de DNA com sequências específicas podem formar grampos ou estruturas cruciformes ou triplex de DNA ou tetraplex de DNA.
- ▶ O RNA mensageiro transfere a informação genética do DNA para os ribossomos para a síntese proteica. O RNA transportador e o RNA ribossômico também estão envolvidos na síntese proteica. O RNA pode ser complexo estruturalmente; cadeias simples de RNA podem se dobrar em grampos, regiões de cadeia dupla ou alças complexas.

Início leitura básica

8.3 Química dos ácidos nucleicos

O papel do DNA como repositório da informação genética depende em parte da sua estabilidade inerente. As transformações químicas que ocorrem geralmente são muito lentas na ausência de um catalisador enzimático. Entretanto, o armazenamento de longo prazo da informação inalterada é tão importante para a célula que mesmo reações muito lentas que alteram a estrutura do DNA podem ser fisiologicamente significativas. Processos como carcinogênese e envelhecimento podem estar intimamente ligados ao acúmulo lento e irreversível de alterações no DNA. Outras alterações, não destrutivas, também ocorrem e são essenciais para a função, como a separação das cadeias que deve preceder a replicação do DNA ou a transcrição. Além de proporcionar maior compreensão dos processos fisiológicos, nosso conhecimento da química dos ácidos nucleicos nos concedeu um conjunto poderoso de tecnologias que tem aplicações em biologia molecular, na medicina e na ciência forense. Agora serão examinadas as propriedades químicas do DNA e algumas dessas tecnologias.

DNA e RNA duplas-hélices podem ser desnaturados

Soluções de DNA nativo isolado cuidadosamente podem ser muito viscosas em pH 7,0 e em temperatura ambiente (25°C). Quando essa solução é submetida a valores de pH extremos ou a temperaturas acima de 80°C, sua viscosidade diminui drasticamente, indicando que o DNA sofreu uma mudança física. Da mesma forma que calor e valores de pH extremos desnaturam proteínas globulares, eles também causam desnaturação, ou fusão, da dupla-hélice do DNA. Rompimento das ligações de hidrogênio entre pares de bases e de bases empilhadas causam desenrolamento da dupla-hélice para formar duas cadeias simples, completamente separadas uma da outra pela molécula inteira ou de

parte da molécula (desnaturação parcial). Nenhuma ligação covalente no DNA é rompida (**Figura 8-26**).

A renaturação da molécula do DNA é um processo rápido de uma etapa, contanto que um segmento helicoidal duplo de pouco mais de uma dúzia de resíduos ainda mantenha as duas cadeias unidas. Quando a temperatura ou o pH retornam para a faixa em que a maioria dos organismos vivem, os segmentos desenrolados das duas cadeias espontaneamente se enrolam, ou **pareiam**, para produzir o duplex intacto (Figura 8-26). Entretanto, se as duas cadeias são separadas completamente, a renaturação ocorre em duas etapas. Na primeira, relativamente lenta, as duas cadeias “acham” uma à outra por colisões aleatórias e formam um segmento pequeno de dupla-hélice complementar. A segunda etapa é muito mais rápida: as bases não pareadas remanescentes vêm sucessivamente se apresentando como pares de bases, e as duas cadeias se unem, como se fosse o fechamento de um zíper, para formar a dupla-hélice.

A estreita interação entre bases empilhadas nos ácidos nucleicos tem o efeito de diminuir sua absorção em luz UV em comparação com a da solução com a mesma concentração de nucleotídeos livres, e a absorção diminui ainda mais quando duas cadeias complementares de ácidos nucleicos estão pareadas. Isso é chamado de efeito hipocrômico. A desnaturação de um ácido nucleico de cadeia dupla produz o resultado oposto: aumento na absorção de-

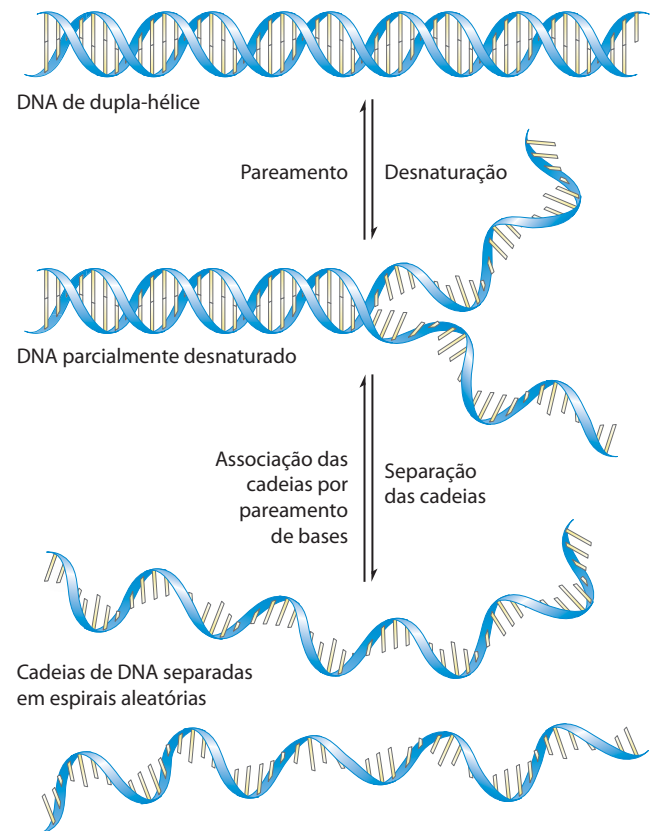


FIGURA 8-26 Desnaturação reversível e anelamento (renaturação) do DNA.

nominado efeito hipercrômico. A transição entre DNA de cadeia dupla e a forma desnaturada de cadeia única pode ser então detectada pelo monitoramento da absorção de luz UV a 260 nm.

Moléculas de DNA bacteriano ou viral em solução desnaturam quando são aquecidas vagarosamente (Figura 8-27). Cada espécie de DNA apresenta uma temperatura de desnaturação característica, ou ponto de fusão (t_m ; formalmente, a temperatura na qual a metade do DNA está presente na forma de cadeias únicas separadas): quanto maior o seu conteúdo de pares de bases G≡C, mais alto o ponto de fusão deste DNA. Isso é devido ao fato de o pareamento de bases G≡C, com três ligações de hidrogênio, necessitar de mais calor para se dissociar do que o pareamento de bases A=T. Portanto, o ponto de fusão da molécula de DNA, determinada sob condições fixas de pH e força iônica, pode produzir uma estimativa da sua composição de bases. Se as condições desnaturantes forem controladas cuidadosamente, regiões que são ricas em pareamentos de bases A=T serão especificamente desnaturadas, enquanto a maior parte do DNA permanece como cadeia dupla. Essas regiões desnaturadas (denominadas

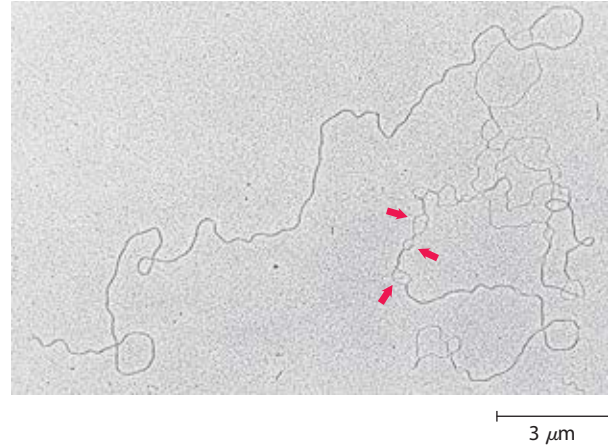


FIGURA 8-28 DNA parcialmente desnaturado. Este DNA foi parcialmente desnaturado, sendo então fixado para evitar renaturação durante o preparo da amostra. O método do sombreamento utilizado para visualizar o DNA nesta micrografia eletrônica aumenta seu diâmetro em aproximadamente cinco vezes e suprime a maioria dos detalhes da hélice. Entretanto, medidas de comprimento podem ser obtidas, e regiões de fita simples são facilmente distinguíveis de regiões de fita dupla. As setas apontam para algumas bolhas de fita simples onde a desnaturação ocorreu. As regiões que desnaturam são altamente reproduzíveis e são ricas em pareamentos de bases A=T.

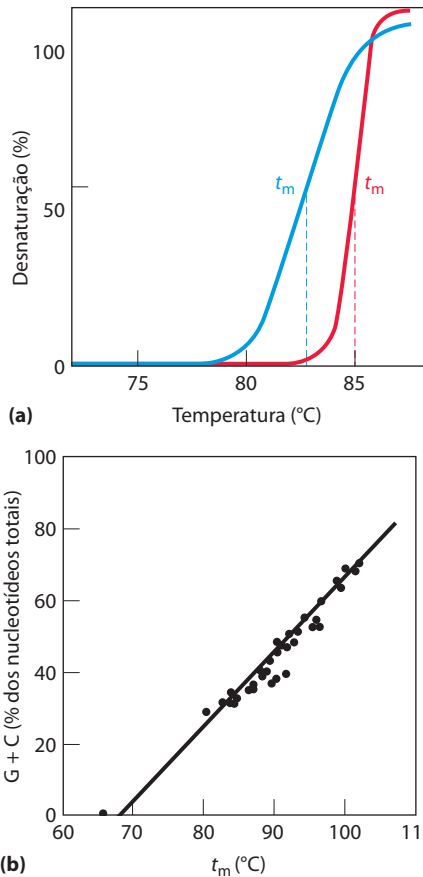


FIGURA 8-27 Desnaturação do DNA pelo calor. (a) As curvas de desnaturação, ou fusão, de duas amostras de DNA. A temperatura no ponto médio da transição (t_m) é o ponto de fusão, que depende do pH, da força iônica e do tamanho e da composição de bases do DNA. (b) Relação entre t_m e o conteúdo G + C do DNA.

bolhas) podem ser visualizadas em microscopia eletrônica (Figura 8-28). Observe que, na separação das cadeias do DNA que ocorre *in vivo* durante processos como replicação de DNA e transcrição, os sítios onde esses processos iniciam são muitas vezes ricos em pares de bases A=T, como será visto a seguir.

Os duplex de duas cadeias de RNA ou uma cadeia de RNA e uma cadeia de DNA (híbrido RNA-DNA) também podem ser desnaturados. Especialmente, os duplex de RNA são mais estáveis que duplex de DNA. Em pH neutro, a desnaturação de RNA de cadeia dupla muitas vezes necessita de temperaturas de 20°C ou mais altas do que as temperaturas necessárias para a desnaturação de uma molécula de DNA com sequência semelhante. A estabilidade de um híbrido RNA-DNA geralmente é intermediária entre a do RNA e a do DNA. As bases físicas para essas diferenças em estabilidade térmica são desconhecidas.

Término leitura básica

Ácidos nucleicos de espécies diferentes podem formar híbridos | **Início leitura avançada**

A capacidade de duas cadeias de DNA parearem uma com a outra pode ser usada para identificar sequências de DNA semelhantes em duas espécies distintas ou no genoma de uma mesma espécie. Se os duplex de DNA isolados de células humanas e de células murinas são completamente desnaturados por aquecimento, sendo então misturados e mantidos em temperaturas em torno de 25°C abaixo do seu t_m por muitas horas, grande quantidade do DNA irá se parear. A taxa de pareamento do DNA é afetada pela temperatura, pelo comprimento e pela concentração dos fragmentos de DNA a serem pareados, pela concentração de sais na mistura de reação e pelas propriedades da sua própria sequência

(isto é, complexidade e conteúdo $G\equiv C$). A temperatura é especialmente importante. Se for muito baixa, sequências curtas de moléculas de DNA com semelhanças coincidentes em partes distantes e heterólogas irão se parear improdutivoamente e interferir com o alinhamento geral de cadeias complementares de DNA. Temperaturas muito altas irão favorecer a desnaturação. A maioria do reanelamento ocorre entre cadeias complementares de DNA murino para formar duplex de DNA murino; do mesmo modo, a maioria das cadeias de DNA humano pareia com cadeias complementares de DNA humano. Entretanto, algumas cadeias de DNA murino irão se associar com cadeias de DNA humano para dar origem a **duplex híbridos**, nos quais segmentos de cadeia de DNA murino formam regiões de pareamento de bases com segmentos de cadeia de DNA humano (**Figura 8-29**). Isso reflete uma herança evolutiva comum; organismos diferentes em geral têm muitas proteínas e RNAs com funções semelhantes e, frequentemente, estruturas semelhantes. Em muitos casos, os DNAs que codificam essas proteínas e RNAs têm sequências semelhantes. Quanto mais próxima a relação evolutiva entre duas espécies, mais facilmente seus DNAs irão hibridizar. Por exemplo, DNA humano hibridiza muito mais facilmente com DNA murino do que com DNA de levedura.

A hibridização de cadeias de DNA de fontes distintas constitui o princípio básico para um poderoso conjunto de metodologias essenciais para a prática moderna de genética molecular. Uma sequência de DNA específica ou um gene pode ser identificado na presença de muitas outras

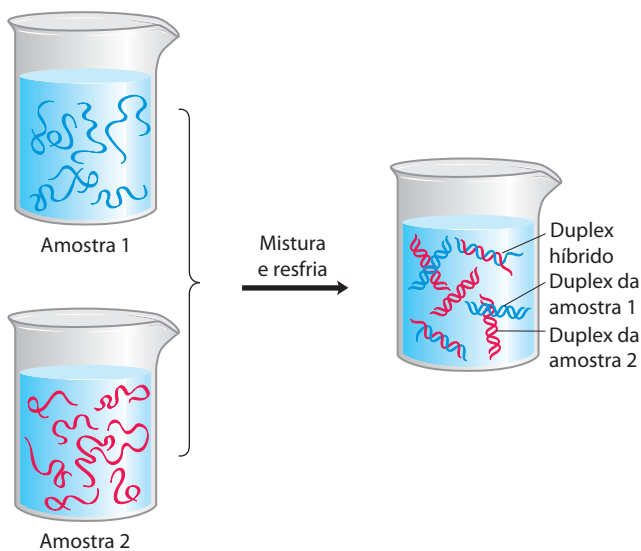



FIGURA 8-29 Hibridização do DNA. Duas amostras de DNA, para serem comparadas, são completamente desnaturadas pelo calor. Quando as duas soluções são misturadas e resfriadas lentamente, as cadeias de DNA de cada amostra irão se associar com seus parceiros complementares normais e se anelar para formar duplex. Se dois DNA têm semelhança de sequência significativa, eles também tendem a formar duplex parciais ou híbridos um com o outro: quanto maior a semelhança de sequência entre dois DNAs, maior o número de híbridos formados. A formação de híbridos pode ser medida de várias maneiras. Um dos DNAs geralmente é marcado com um isótopo radioativo para simplificar sua detecção e as medidas.

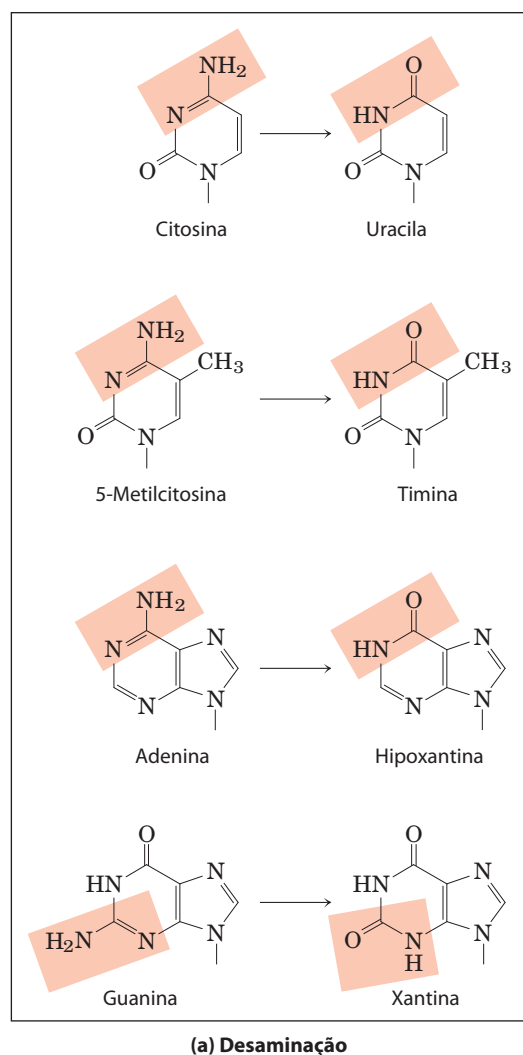
sequências, se já existir uma cadeia de DNA complementar (geralmente marcada de alguma forma) adequada para hibridizar com ela (Capítulo 9). O DNA complementar pode ser de uma espécie diferente ou da mesma espécie, ou pode ser sintetizado quimicamente no laboratório usando técnicas descritas a seguir neste capítulo. Técnicas de hibridização podem ser adaptadas para detectar um RNA em vez de um DNA. O isolamento e a identificação de genes específicos e RNA se baseiam nessas técnicas de hibridização. Aplicações dessa tecnologia tornam possível a identificação de um indivíduo com base em um único fio de cabelo deixado na cena de um crime ou a predição do início de uma doença décadas antes do aparecimento dos sintomas (ver Quadro 9-1).

Nucleotídeos e ácidos nucleicos sofrem transformações não enzimáticas

 Purinas e pirimidinas, juntamente com os nucleotídeos dos quais elas são parte, sofrem alterações espontâneas na sua estrutura covalente. O índice dessas reações em geral é *muito lento*, mas essas reações são fisiologicamente significativas devido à tolerância muito baixa da célula para alterações em sua informação genética. Alterações na estrutura do DNA que produzem mudanças permanentes na informação genética codificadas pelo DNA são chamadas de **mutações**, e muitas evidências sugerem uma ligação estreita entre o acúmulo de mutações em um organismo individual e os processos de envelhecimento e carcinogênese.

Várias bases nucleotídicas sofrem perda espontânea de seus grupamentos amino exocíclicos (desaminação) (**Figura 8-30a**). Por exemplo, em condições celulares típicas, a desaminação da citosina (no DNA) a uracila ocorre em aproximadamente um em cada 10^7 resíduos de citidina em 24 horas. Isso corresponde a cerca de 100 eventos espontâneos por dia, em média, em uma célula de mamífero. A desaminação de adenina e guanina ocorre em taxas de cerca de 1/100.

A reação lenta de desaminação da citosina parece inócua o suficiente, mas é quase seguramente a razão pela qual o DNA contém timina em vez de uracila. O produto da desaminação da citosina (uracila) é rapidamente reconhecido como estranho no DNA, sendo removido pelo sistema de reparo (Capítulo 25). Se o DNA normalmente tivesse uracila, o reconhecimento de uracilas resultantes da desaminação da citosina seria mais difícil, e uracilas não reparadas conduziriam a mudanças permanentes na sequência, fazendo o pareamento com adeninas durante a replicação. A desaminação de citosina gradualmente conduziria a uma diminuição nos pares de bases $G\equiv C$ e a um aumento nos pares de bases $A\equiv U$ no DNA de todas as células. Através dos milênios, a desaminação de citosina poderia eliminar pares de bases $G\equiv C$ e o código genético que depende desses pares de bases. O estabelecimento da timina como uma das quatro bases no DNA pode ter sido um dos pontos cruciais de reviravolta na evolução, tornando possível o armazenamento de longo prazo da informação genética.



Outra reação importante nos desoxirribonucleotídeos é a hidrólise da ligação *N*- β -glicosídica entre a base e a pentose, para criar uma lesão no DNA chamada de sítio AP (apurínico, apirimidínico) ou sítio abásico (Figura 8-30b). Isso ocorre a uma taxa maior para purinas do que para pirimidinas. Cerca de uma em cada 10^5 purinas (10.000 por célula de mamíferos) é perdida do DNA a cada 24 horas em condições celulares típicas. A depurinação de ribonucleotídeos e do RNA é muito mais lenta e, em geral, não é considerada fisiologicamente significativa. No tubo de ensaio, a perda de purinas pode ser acelerada por ácido diluído. Incubação de DNA em pH 3 causa remoção seletiva de bases púricas, resultando no derivado denominado ácido apurínico.

Outras reações são promovidas pela radiação. A luz UV induz a condensação de dois grupos etílicos para formar um anel ciclobutano. Na célula, a mesma reação entre bases pirimídicas adjacentes nos ácidos nucleicos forma dímeros pirimídicos ciclobutanos. Isso ocorre mais frequentemente entre resíduos de timina adjacentes na mesma hélice de DNA (Figura 8-31). Um segundo tipo de dímero de pirimidinas, chamado de fotoproduto 6-4, também é formado durante irradiação UV. Radiações ionizantes (raios X e raios gama) podem causar abertura de anel e fragmentação de

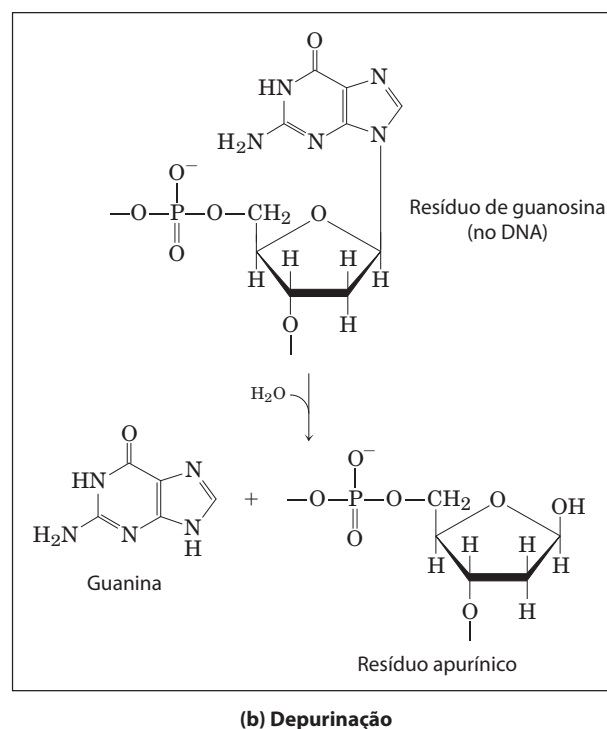


FIGURA 8-30 Algumas reações não enzimáticas bem caracterizadas dos nucleotídeos. (a) Reações de desaminação. Apenas a base está mostrada. (b) Depurinação, em que uma purina é perdida pela hidrólise da ligação *N*- β -glicosídica. A perda de pirimidinas ocorre por meio de uma reação semelhante, mas muito mais lentamente. A lesão resultante, com a desoxirribose presente e a base ausente, é chamada de sítio abásico ou sítio AP (sítio apurínico ou, raramente, apirimidínico). A desoxirribose remanescente após a depurinação é rapidamente convertida de β -furanose para a forma aldeídica (ver Figura 8-3), desestabilizando ainda mais o DNA nessa posição. Reações não enzimáticas adicionais estão ilustradas nas Figuras 8-31 e 8-32.

bases, assim como quebras dos esqueletos covalentes dos ácidos nucleicos.

Praticamente todas as formas de vida são expostas a radiação de alta energia capaz de causar mudanças químicas no DNA. Sabe-se que a radiação UV curta (com comprimento de ondas de 200 a 400 nm), que compõe uma porção significativa do espectro solar, causa a formação de dímeros de pirimidina e outras mudanças químicas no DNA de bactérias e de células da pele humana. Humanos estão sujeitos constantemente a um campo de radiações ionizantes na forma de raios cósmicos, os quais podem penetrar profundamente na terra, assim como às radiações emitidas por elementos radioativos, como rádio, plutônio, urânio, radônio, ^{14}C e ^3H . Raios X usados em exames médicos e dentais e na radioterapia de câncer e outras doenças são outra forma de radiação ionizante. É estimado que radiações ionizantes e UV sejam responsáveis por cerca de 10% de todo dano no DNA causado por agentes ambientais.

O DNA também pode ser danificado por reagentes químicos introduzidos no ambiente como produtos de atividade industrial. Tais produtos podem não ser prejudiciais por si só, mas podem ser metabolizados pelas células em formas que o são. Existem duas classes principais desses compos-

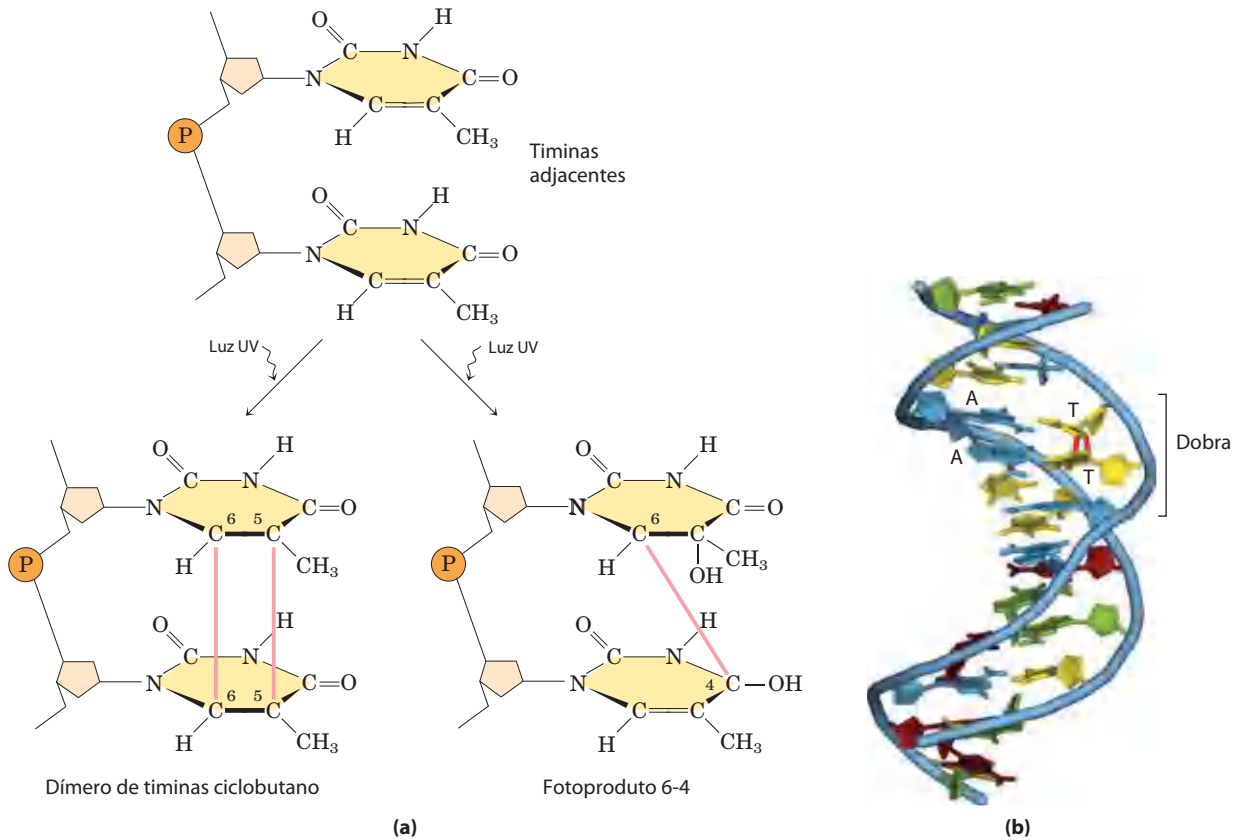


FIGURA 8-31 Formação de dímeros de pirimidinas induzidos por luz UV. (a) Um tipo de reação (à esquerda) resulta na formação de um anel ciclobutil envolvendo C-5 e C-6 de resíduos de pirimidinas adjacentes. Uma reação alternativa (à direita) resulta no fotoproduto 6-4, com uma ligação en-

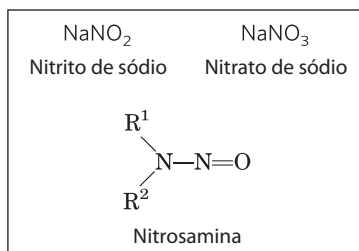
tre C-6 de uma pirimidina e C-4 da pirimidina vizinha. (b) A formação de um dímero de pirimidinas ciclobutano introduz um ângulo ou dobra no DNA (PDB ID 1TTD).

tos (**Figura 8-32**): (1) agentes desaminantes, especialmente ácido nitroso (HNO_2) ou compostos que podem ser metabolizados a ácido nitroso ou nitritos e (2) agentes alquilantes.

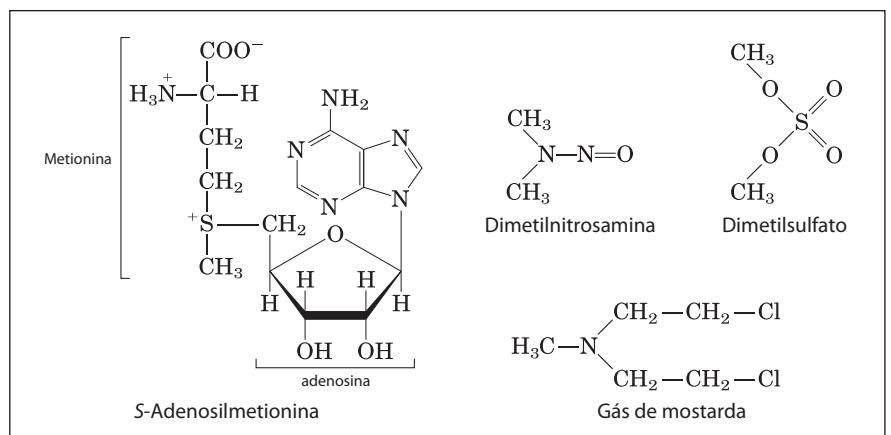
O ácido nitroso, formado a partir de precursores orgânicos, como nitrosaminas, e a partir de sais de nitrito e de nitratos, é um potente acelerador de desaminação de bases. O bissulfito tem efeitos semelhantes. Ambos os agentes são

usados como conservantes em alimentos processados para evitar o crescimento de bactérias tóxicas. Eles não parecem aumentar significativamente os riscos de câncer quando usados dessa forma, talvez pelo fato de serem usados em pequenas quantidades e representarem apenas uma pequena contribuição para os níveis de dano no DNA. (O risco potencial para a saúde de alimentos estragados seria muito maior se esses conservantes não fossem usados.)

FIGURA 8-32 Agentes químicos que causam dano ao DNA. (a) Precursores de ácido nitroso, que promovem reações de desaminação. (b) Agentes alquilantes. Apenas a S-adenosilmetionina age enzimaticamente.

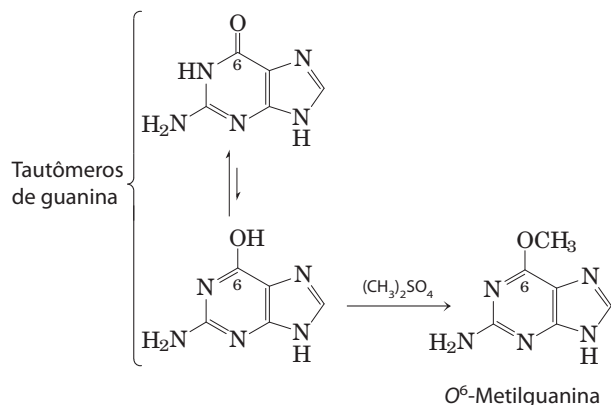


(a) Precursores do ácido nitroso



(b) Agentes alquilantes

Agentes alquilantes podem alterar certas bases do DNA. Por exemplo, o reagente químico dimetilsulfato (Figura 8-32b) pode metilar a guanina para produzir O^6 -metilguanina, a qual não pode parear com a citosina.



Muitas reações semelhantes são realizadas por agentes alquilantes normalmente presentes nas células, como *S*-adenosilmetionina.

A fonte mais importante de alterações mutagênicas no DNA é o dano oxidativo. Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e radicais superóxidos, surgem durante irradiação ou como um subproduto do metabolismo aeróbio. Dessas espécies, os radicais hidroxila são responsáveis pela maioria dos danos oxidativos no DNA. As células têm um sistema de defesa elaborado para destruir espécies reativas de oxigênio, incluindo enzimas como a catalase e a superóxido-dismutase, que convertem espécies reativas de oxigênio a produtos inofensivos. Entretanto, uma fração desses oxidantes inevitavelmente escapa das defesas celulares e o dano ao DNA ocorre por meio de um grande e complexo grupo de reações, que variam de oxidação da desoxirribose e das bases a quebras na hélice. Estimativas precisas da extensão desse dano não estão disponíveis, mas cada dia o DNA de cada célula humana está sujeito a milhares de reações oxidativas que causam dano.

Isso é apenas uma amostra das reações mais conhecidas que causam dano ao DNA. Muitos compostos carcinogênicos nos alimentos, na água e no ar exercem seus efeitos cancerígenos por modificações das bases do DNA. Apesar disso, a integridade do DNA como polímero é mais bem mantida do que a do RNA e da proteína, pois o DNA é a única macromolécula que se beneficia de sistemas de reparo bioquímicos. Esses processos de reparo (descritos no Capítulo 25) diminuem muito o impacto do dano ao DNA. ■

Algumas bases do DNA são metiladas

Certas bases nucleotídicas em moléculas de DNA são metiladas enzimaticamente. A adenina e a citosina são metiladas com mais frequência do que guanina e timina. A metilação geralmente é restrita a certas sequências ou regiões da molécula de DNA. Em alguns casos, a função da metilação é bem conhecida; em outros, a função permanece obscura. Todas as metilases de DNA conhecidas usam *S*-adenosilmetionina como doador de um grupo metila (Figura 8-32b). A *E. coli* tem dois sistemas notáveis de metilação. Um serve

como parte de um mecanismo de defesa que ajuda a célula a distinguir seu DNA do DNA exógeno por marcar seu próprio DNA com grupos metila e destruir o DNA (exógeno) sem os grupos metila (isso é conhecido como um sistema de modificação-restrição; ver p. 314). O outro sistema metila resíduos de adenosina dentro da sequência (5')GATC(3') a N^6 -metiladenosina (Figura 8-5a). Isso é mediado pela Dam (*DNA adenine methylation*) metilase, um componente de um sistema que repara pares de bases mal pareados formados ocasionalmente durante a replicação do DNA (ver Figura 25-21).

Em células eucarióticas, em torno de 5% dos resíduos de citidina no DNA são metilados a 5-metilcitidina (Figura 8-5a). A metilação é mais comum em sequências CpG, produzindo metil-CpG simetricamente em ambas as hélices do DNA. A extensão da metilação em sequências CpG varia de acordo com a região molecular em grandes moléculas de DNA eucariótico.

As sequências de longas hélices de DNA podem ser determinadas

Por sua capacidade de ser um repositório de informação, a propriedade mais importante de uma molécula de DNA é a sua sequência de nucleotídeos. Até o final dos anos de 1970, a determinação da sequência de um ácido nucleico contendo até mesmo 5 ou 10 nucleotídeos era muito trabalhosa. O desenvolvimento de duas novas técnicas em 1977, uma por Alan Maxam e Walter Gilbert e a outra por Frederick Sanger, tornou possível o sequenciamento de moléculas grandes de DNA com uma tranquilidade não imaginada poucos anos antes. As técnicas contavam com um melhor conhecimento da química dos nucleotídeos e do metabolismo do DNA e em métodos eletroforéticos para separação das cadeias de DNA diferindo em tamanho por apenas um nucleotídeo. A eletroforese de DNA é semelhante a das proteínas (ver Figura 3-18). Poliacrilamida muitas vezes é usada como a matriz do gel para pequenas moléculas de DNA (até poucas centenas de nucleotídeos); agarose geralmente é usada para fragmentos maiores de DNA.

Em ambos os sequenciamentos de Maxam-Gilbert e de Sanger, o princípio geral é reduzir o DNA a quatro grupos de fragmentos marcados. A reação que produz cada um desses grupos é base-específica, de forma que os comprimentos dos fragmentos correspondem a posições de uma determinada base na sequência de DNA. Por exemplo, para um oligonucleotídeo com a sequência pAATCGACT, marcado na extremidade 5' (a extremidade à esquerda), uma reação que quebra o DNA após cada resíduo de C irá gerar dois fragmentos marcados: um fragmento de quatro nucleotídeos e um fragmento de sete nucleotídeos; uma reação que quebra o DNA após cada resíduo de G irá produzir apenas um fragmento marcado de cinco nucleotídeos. Devido aos fragmentos serem marcados radioativamente nas suas extremidades 5', apenas o fragmento no lado 5' da quebra é visualizado. Os tamanhos dos fragmentos correspondem às posições relativas dos resíduos de C e G na sequência. Quando os grupos de fragmentos que correspondem a cada uma das quatro bases são separados eletroforicamente lado a lado, eles produzem uma escada de bandas na qual a sequência pode ser lida diretamente (Figura 8-33). Aqui

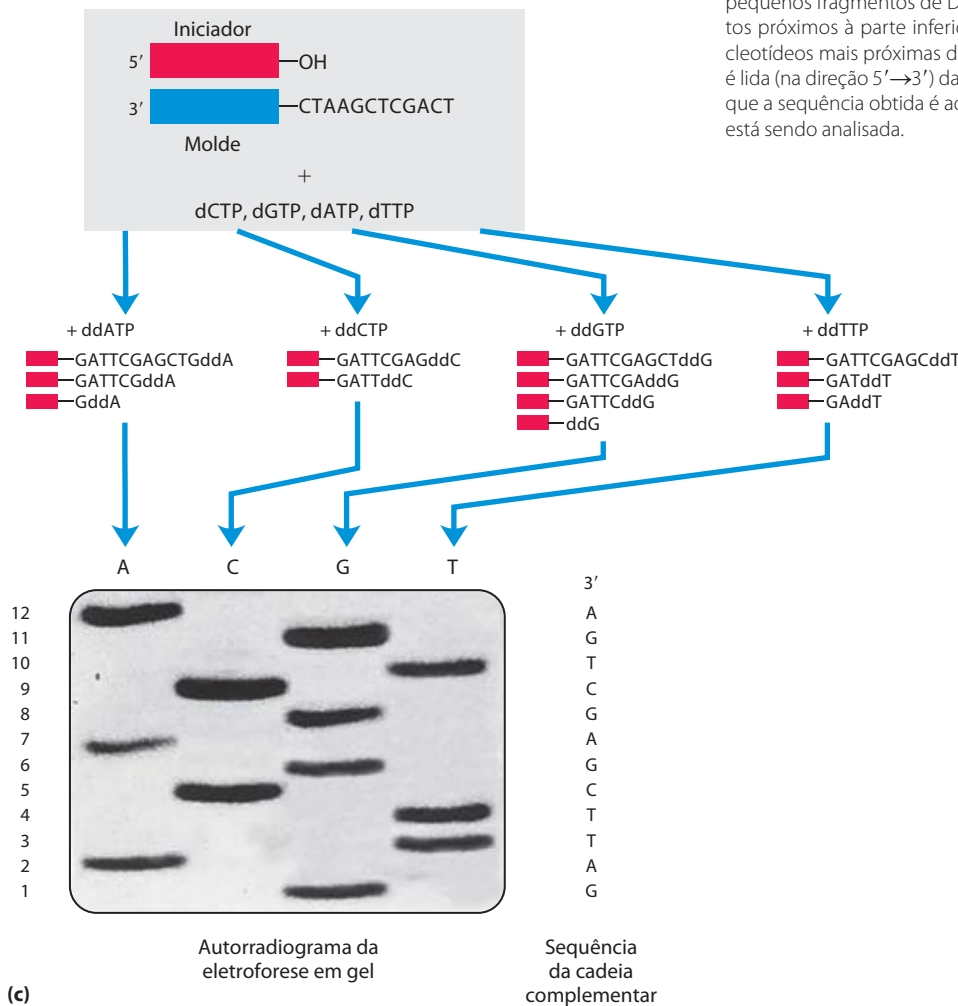
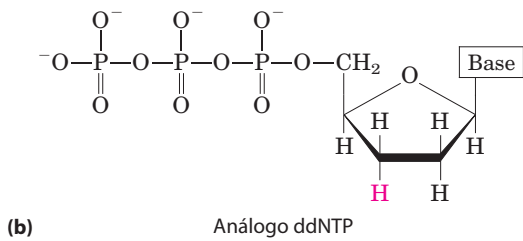
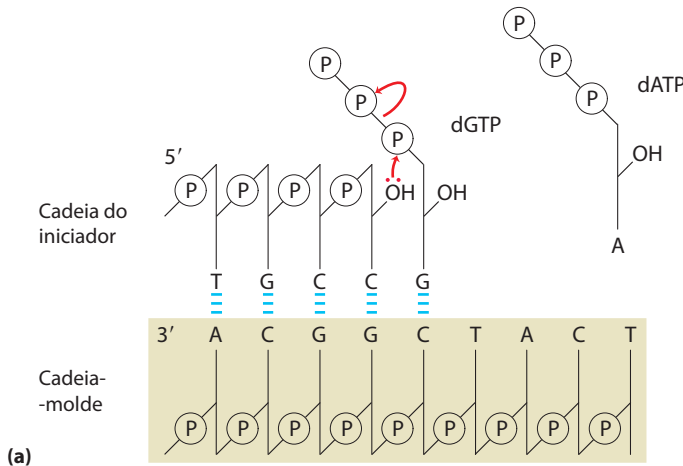


FIGURA 8-33 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.

Esse método utiliza o mecanismo de síntese de DNA pela DNA-polimerase (Capítulo 25). **(a)** As DNA-polimerases necessitam de um iniciador (uma cadeia oligonucleotídica curta), ao qual os nucleotídeos serão adicionados, e uma cadeia-molde para guiar a seleção de cada novo nucleotídeo. Nas células, o grupo 3'-hidroxila do iniciador reage com um desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) que está entrando para formar uma nova ligação fosfodiéster. **(b)** O procedimento do sequenciamento de Sanger usa análogos de dideoxinucleosídeos trifosfatos (ddNTP) para interromper a síntese de DNA. (O método de Sanger também é conhecido como o método dideoxi.) Quando um ddNTP é introduzido no lugar de um dNTP, o alongamento da cadeia para após a adição do análogo, porque falta o grupo 3'-hidroxila necessário para o próximo passo. **(c)** O DNA a ser sequenciado é usado como a cadeia-molde, e um iniciador curto, marcado radioativamente ou com fluorescência, paraia com ele. Pela adição de pequenas quantidades de um único ddNTP, por exemplo, ddCTP, a um sistema normal de reação, as cadeias sintetizadas serão prematuramente terminadas em determinadas posições quando um dC ocorre normalmente. Dado o excesso de dCTP sobre o ddCTP, a chance do análogo ser incorporado sempre que dC deve ser adicionado é pequena. Entretanto, ddCTP está presente em quantidades suficientes para assegurar que cada nova cadeia tenha uma probabilidade alta de adquirir pelo menos um ddC em algum ponto durante a síntese. O resultado é uma solução contendo uma mistura de fragmentos marcados, cada um deles terminando com um resíduo de C. Cada resíduo de C na sequência produz um grupo de fragmentos de um tamanho específico, de forma que os fragmentos de tamanhos diferentes, separados por eletroforese, demonstram a localização do resíduo de C. Esse procedimento é repetido separadamente para cada um dos quatro ddNTP e a sequência pode ser lida diretamente do autorradiograma do gel. Como pequenos fragmentos de DNA migram mais rapidamente, os fragmentos próximos à parte inferior do gel representam as posições dos nucleotídeos mais próximas do iniciador (a extremidade 5') e a sequência é lida (na direção 5'→3') da parte inferior para a parte superior. Observe que a sequência obtida é aquela da cadeia complementar à cadeia que está sendo analisada.

é ilustrado apenas o método de Sanger, o mais fácil tecnicamente e mais difundido. Esse método requer a síntese enzimática de uma cadeia complementar de DNA à cadeia que está sendo analisada, usando um “iniciador” marcado radioativamente e didesoxinucleotídeos.

Desde que esses primeiros métodos práticos de sequenciamento de DNA apareceram, a metodologia melhorou rapidamente. Muito desse avanço foi alimentado pelo Projeto Genoma Humano, descrito no Capítulo 9. Uma variação do método de sequenciamento de Sanger, em que os didesoxinucleotídeos usados para cada reação são marcados com diferentes marcadores fluorescentes coloridos (Figura 8-34), foi usada nos esforços iniciais para automatizar grandes esforços de sequenciamento de DNA. Com essa tecnologia, os pesquisadores podem sequenciar moléculas de DNA contendo milhares de nucleotídeos em poucas horas. Essa estratégia foi usada maciçamente nos esforços iniciais para sequenciar genomas inteiros de organismos e é ainda usado para sequenciamento de rotina de genes ou segmentos de DNA. Entretanto, sequenciamentos genômicos modernos usam agora métodos muito mais eficientes, muitas vezes chamados de próxima geração ou **sequenciamento de próxima geração**. Eles estão descritos no Capítulo 9. **Sequenciamento de didesoxi de DNA**

A síntese química de DNA foi automatizada

Um importante avanço prático na química de ácidos nucleicos foi a síntese rápida e precisa de oligonucleotídeos pequenos de sequência conhecida. Os métodos foram desenvolvidos por H. Gobind Khorana e seus colegas nos anos de 1970. Refinamentos introduzidos por Robert Letsinger e Marvin Caruthers conduziram à química agora usada em larga escala, denominada método de fosforamídita (Figura 8-35). A síntese é conduzida com a cadeia em crescimento fixada a um suporte sólido, usando fundamentos semelhantes àqueles usados por Merrifield para a síntese de peptídeos (ver Figura 3-32), sendo facilmente automatizada. A eficiência de cada etapa é muito alta, permitindo a síntese rotineira de polímeros contendo 70 ou 80 nucleotídeos e, em alguns laboratórios, cadeias muito mais longas. A disponibilidade de polímeros de DNA relativamente baratos com sequências pré-desenhadas está tendo um impacto poderoso em todas as áreas da bioquímica (Capítulo 9).

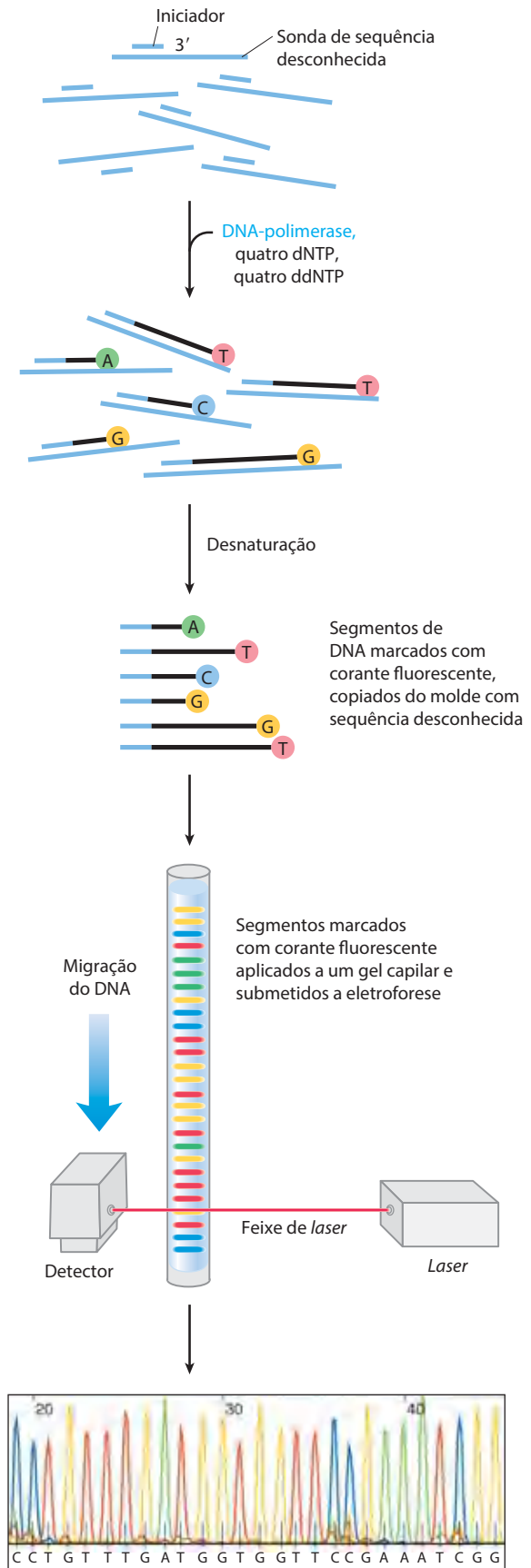


FIGURA 8-34 Estratégia para automação de reações de sequenciamento de DNA. Cada didesoxinucleotídeo usado no método de Sanger pode ser acoplado a uma molécula fluorescente que concede uma cor específica a todos os fragmentos terminados naquele nucleotídeo. Todos os quatro ddNTP marcados são adicionados em um tubo único. Os fragmentos de DNA coloridos resultantes são então separados por tamanho em um único gel eletroforético contido em um tubo capilar (aprimoramento da eletroforese em gel que permite separações mais rápidas). Todos os fragmentos de um determinado tamanho migram pelo gel do tubo capilar em um único pico e a cor associada com cada pico é detectada usando um feixe de laser. A sequência de DNA é lida pela determinação da sequência de cores nos picos à medida que passam pelo detector. Essa informação é alimentada diretamente a um computador, o qual determina a sequência.

RESUMO 8.3 Química dos ácidos nucleicos

- ▶ O DNA nativo passa por desenrolamento reversível e separação de cadeias (fusão) sob aquecimento ou em pH extremos. DNAs ricos em pares G≡C têm ponto de fusão maior do que DNAs ricos em pares A=T.
- ▶ DNAs de cadeia simples desnaturados de duas espécies podem formar um duplex híbrido, sendo que o grau de hibridização depende da extensão de sequências semelhantes. A hibridização é a base de técnicas importantes usadas no estudo e no isolamento de genes específicos e RNA.
- ▶ O DNA é um polímero relativamente estável. Reações espontâneas como a desaminação de certas bases, a hidrólise da ligação *N*-glicosídica base-açúcar, a formação de dímeros de pirimidina induzida por radiação e o dano oxidativo ocorrem em taxas muito baixas, mas são importantes devido à tolerância muito baixa da célula a mudanças no material genético.
- ▶ Sequências de DNA podem ser determinadas por uma variedade de métodos modernos.

▶ Oligonucleotídeos de sequências conhecidas podem ser sintetizados rápida e acuradamente.

Término leitura avançada

8.4 Outras funções dos nucleotídeos

Além das suas funções como subunidades dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos têm uma variedade de outras funções em cada célula: como carreadores de energia, componentes de cofatores enzimáticos e mensageiros químicos. **Início leitura básica**

Os nucleotídeos carregam energia química nas células

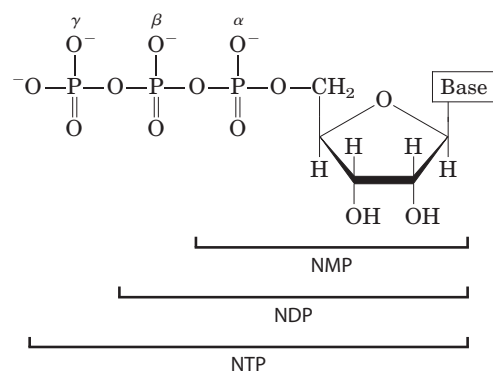
O grupo fosfato ligado covalentemente na hidroxila 5' de um ribonucleotídeo pode ter um ou dois fosfatos adicionais ligados. As moléculas resultantes são conhecidas como nucleosídeos mono, di e trifosfatos (**Figura 8-36**). Iniciando a partir da ribose, os três fosfatos geralmente são rotulados α , β e γ . A hidrólise de nucleosídeos trifosfatos produz a energia química para direcionar muitas reações

celulares. A adenosina 5'-trifosfato, ATP, é sem dúvida o mais amplamente utilizado em algumas reações, mas UTP, GTP e CTP também são usados em algumas reações. Os nucleosídeos trifosfatos também servem como os precursores ativados na síntese de DNA e de RNA, como descrito nos Capítulos 25 e 26.

A estrutura do grupo trifosfato é a responsável pela energia liberada durante a hidrólise do ATP e de outros nucleosídeos trifosfatos. A ligação entre a ribose e o fosfato α é uma ligação éster. As ligações α,β e β,γ são fosfoanídricas (**Figura 8-37**). A hidrólise de ligações éster rende cerca de 14 kJ/mol em condições padrão, ao passo que a hidrólise de cada ligação anidrido produz cerca de 30 kJ/mol. A hidrólise do ATP muitas vezes exerce uma função termodinâmica importante na biossíntese. Quando acoplada a uma reação com variação de energia livre positiva, a hidrólise do ATP muda o equilíbrio do processo geral para favorecer a formação do produto (lembre-se da relação entre a constante de equilíbrio e a variação de energia livre descrita pela Equação 6-3 na p. 194).

Nucleotídeos da adenina são componentes de muitos cofatores enzimáticos

Uma série de cofatores enzimáticos que serve a uma ampla gama de funções químicas inclui a adenosina como parte de suas estruturas (**Figura 8-38**). Eles não são estruturalmente relacionados, exceto pela presença de adenosina. Em nenhum desses cofatores a porção da adenosina participa diretamente da função principal, mas a remoção da adenosina em geral resulta em uma redução drástica da atividade do cofator. Por exemplo, a remoção do nucleotídeo adenina (3'-fosfoadenosina-difosfato) da acetoacetil-CoA, a coenzima A derivada do acetoacetato, reduz sua reatividade como substrato para a β -cetoacil-CoA-transferase (enzima do metabolismo dos lipídeos) por um fator de 10^6 . Apesar dessa exigência por adenosina não ter sido investigada detalhadamente, ela deve envolver a energia de ligação entre a enzima e o substrato (ou cofator) que é usada na catálise e na estabilização do complexo enzima-substrato inicial (Capítulo 6). No caso da β -cetoacil-CoA-transferase, a porção nucleotídica da coenzima A parece



Abreviações dos ribonucleosídeos 5'-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	AMP	ADP	ATP
Guanina	GMP	GDP	GTP
Citosina	CMP	CDP	CTP
Uracila	UMP	UDP	UTP

Abreviações dos desoxirribonucleosídeos 5'-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	dAMP	dADP	dATP
Guanina	dGMP	dGDP	dGTP
Citosina	dCMP	dCDP	dCTP
Timina	dTMP	dTDP	dTTP

FIGURA 8-36 Nucleosídeos fosfatos. Estrutura geral dos nucleosídeos 5'-mono, di e trifosfatos (NMP, NDP e NTP) e suas abreviações-padrão. Nos

didesoxirribonucleosídeos fosfatos (dNMP, dNDP e dNTP), a pentose é 2'-desóxi-D-ribose.

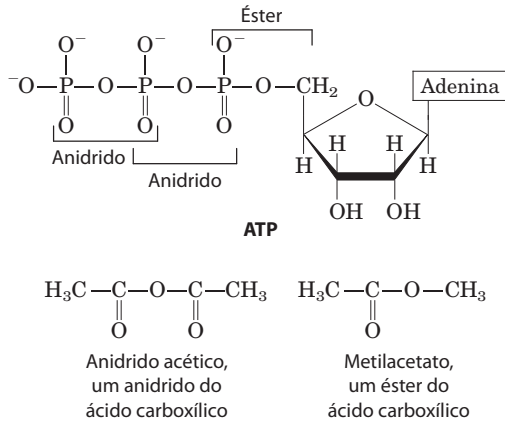


FIGURA 8-37 Ligações de éster de fosfato e fosfoanidrido do ATP. A hidrólise de uma ligação anidrido produz mais energia do que a hidrólise do éster. O anidrido do ácido carboxílico e o éster do ácido carboxílico estão mostrados para comparação.

ser uma “alavanca” de ligação que ajuda a puxar o substrato (acetoacetyl-CoA) para o sítio ativo. Funções semelhantes podem ser encontradas para a porção nucleosídica de outros cofatores nucleotídicos.

Por que a adenosina é usada nessas estruturas, em vez de outras moléculas grandes? A resposta nesse caso pode envolver uma forma de economia evolutiva. Certamente a adenosina não é a única que contribui para a quantidade de energia potencial de ligação. A importância da adenosina provavelmente não está tanto em alguma característica química especial, mas na vantagem evolutiva de usar um composto para múltiplas funções. Uma vez que o ATP tornou-se a fonte universal de energia química, foram desenvolvidos sistemas para sintetizar ATP em maior quantidade do que outros nucleotídeos. Por ser abundante, se torna a escolha lógica para a incorporação em uma ampla variedade de estruturas. A economia se estende à estru-

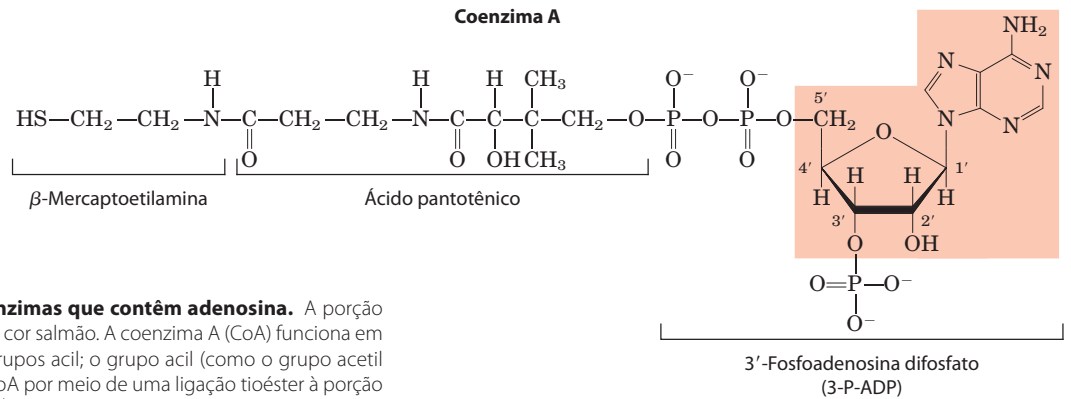
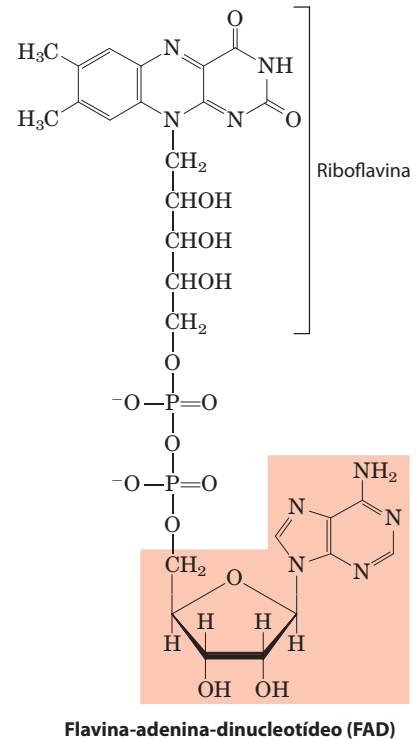
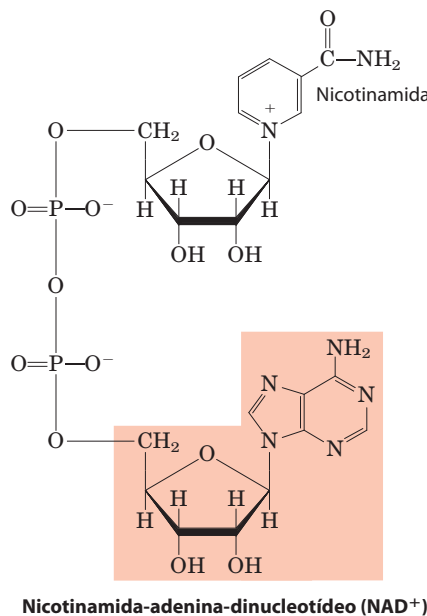


FIGURA 8-38 Algumas coenzimas que contêm adenosina. A porção adenosina está sombreada em cor salmão. A coenzima A (CoA) funciona em reações de transferência de grupos acil; o grupo acil (como o grupo acetil ou acetoacetyl) é acoplado à CoA por meio de uma ligação tioéster à porção β-mercaptoetanolamina. NAD⁺ atua nas transferências de hidretos e FAD, a forma ativa da vitamina B₂ (riboflavina), em transferências de elétrons. Outra coenzima que incorpora adenosina é a 5'-desoxiadenosilcobalamina, a forma ativa da vitamina B₁₂ (ver Quadro 17-2), a qual participa em transferências de grupos intramoleculares entre carbonos adjacentes.



ra da proteína. Um domínio proteico único que liga adenosina pode ser usado em enzimas diferentes. Tal domínio, denominado **cavidade de ligação de nucleotídeo**, é encontrado em muitas enzimas que ligam ATP e cofatores nucleotídicos.

Alguns nucleotídeos são moléculas reguladoras

Células respondem a seu ambiente por receberem avisos dos hormônios ou outros sinais químicos externos. A interação desses sinais químicos extracelulares (“primeiros mensageiros”) com receptores na superfície da célula muitas vezes leva à produção de **segundos mensageiros** dentro da célula, os quais, por sua vez, conduzem a mudanças adaptativas no interior da célula (Capítulo 12). Muitas vezes, o segundo mensageiro é um nucleotídeo (**Figura 8-39**). Um dos mais comuns é a **adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico, ou cAMP)**, formado a partir de ATP em uma reação catalisada pela adenilil-ciclase, uma enzima associada com a face interna da membrana plasmática. O AMP cíclico exerce funções reguladoras em todas as células

fora do reino vegetal. A guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) ocorre em muitas células e também tem funções reguladoras.

Outro nucleotídeo regulador, ppGpp (**Figura 8-39**), é produzido em bactérias como resposta a uma redução de velocidade da síntese proteica durante a falta de aminoácidos. Esse nucleotídeo inibe a síntese de moléculas de rRNA e tRNA (ver **Figura 28-22**) necessárias para a síntese proteica, prevenindo a produção desnecessária desses ácidos nucleicos.

RESUMO 8.4 Outras funções dos nucleotídeos

▶ O ATP é o carregador central de energia química nas células. A presença de uma porção adenosina em uma variedade de cofatores enzimáticos pode ser relacionada a necessidades de energia de ligação.

▶ O AMP cíclico, formado a partir de ATP em uma reação catalisada pela adenilil-ciclase, é um segundo mensageiro comum produzido em resposta a hormônios e outros sinais químicos.

Término leitura básica

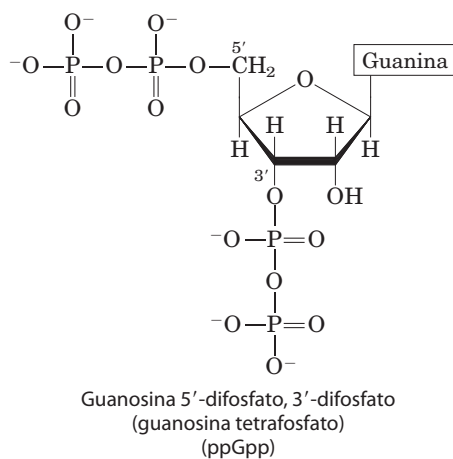
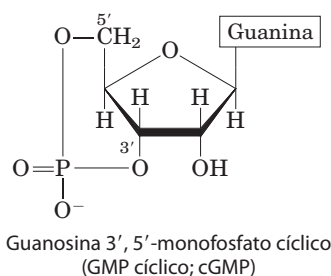
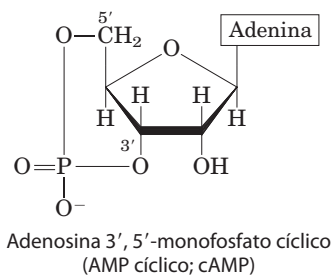


FIGURA 8-39 Três nucleotídeos reguladores.

Termos-chave

Os termos em negrito estão definidos no glossário.

gene 281	sulco maior 289
RNA ribossômico (rRNA) 281	sulco menor 289
RNA mensageiro (mRNA) 281	forma B do DNA 291
RNA transportador (tRNA) 281	forma A do DNA 291
nucleotídeo 281	forma Z do DNA 291
nucleosídeo 281	palíndromo 291
pirimidina 282	grampo 292
purina 282	cruciforme 292
desoxirribonucleotídeo 282	triplex de DNA 292
ribonucleotídeo 283	tetraplex G 292
ligação fosfodiéster 284	transcrição 294
extremidade 5' 285	mRNA
extremidade 3' 285	monocitrônico 294
oligonucleotídeo 286	mRNA policitrônico 294
polinucleotídeo 286	mutação 299
par de bases 287	segundo mensageiro 308
	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico, cAMP) 308

Leituras adicionais

Geral

Cox, M.M., Doudna, J.A., & O'Donnell, M. (2012) *Molecular Biology: Principles and Practice*, W. H. Freeman and Company, New York.

O melhor lugar para aprofundar o aprendizado sobre a estrutura e a função dos ácidos nucleicos.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., & Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edn, ASM Press, Washington, DC.

Boa fonte de informações adicionais sobre a química de nucleotídeos e ácidos nucleicos.

Histórico

- Judson, H.F.** (1996) *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, expanded edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Olby, R.C.** (1994) *The Path to the Double Helix: The Discovery of DNA*, Dover Publications, Inc., New York.
- Sayre, A.** (1978) *Rosalind Franklin and DNA*, W.W. Norton & Co., Inc., New York.
- Watson, J.D.** (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*, Atheneum, New York [Paperback edition, Touchstone Books, 2001.]

Estrutura dos ácidos nucleicos

- Frank-Kamenetskii, M.D. & Mirkin, S.M.** (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65-95.
- Holbrook, S.R.** (2008) Structural principles from large RNA. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 445-464.
- Keniry, M.A.** (2000) Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers* **56**, 123-146.
Bom resumo das propriedades estruturais dos quadruplex.

Química dos ácidos nucleicos

- Bonetta, L.** (2006) Genome sequencing in the fast Lane. *Nat. Methods* **3**, 141-147.
Este artigo introduz uma nova geração de métodos de sequenciamento descritos no Capítulo 9.
- Collins, A.R.** (1999) Oxidative damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**, 238-246.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunt, J.** (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195-1214.
- Imlay, J.A.** (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 755-776.
- Marnett, L.J. & Plataras, J.P.** (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* **17**, 214-221.

ATP como carreador de energia

- Jencks, W.P.** (1987) Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 65-73.
Artigo relativamente curto, mas cheio de conhecimentos.

Problemas

- Estrutura de nucleotídeos.** Quais posições no anel purínico dos nucleotídeos purínicos do DNA têm potencial para formar ligações de hidrogênio, mas não estão envolvidas no pareamento de base de Watson-Crick?
- Sequência de bases das fitas de DNA complementar.** Uma cadeia de um DNA de fita dupla tem a sequência (5')GCG-CAATATTTCTCAAATATTGCGC(3'). Escreva a sequência de bases da fita complementar. Que tipo especial de sequência está contido nesse segmento de DNA? O DNA de cadeia dupla tem potencial para formar algumas estruturas alternativas?
- DNA do corpo humano.** Calcule o peso em gramas de uma molécula de DNA de fita dupla esticada da Terra até a Lua (~320.000 km). A dupla-hélice de DNA pesa em torno de 1×10^{-18} g por 1.000 pares de nucleotídeos; cada par de bases abrange 3,4 Å. Para uma comparação interessante, seu corpo contém aproximadamente 0,5 g de DNA!

4. Enovelamento do DNA. Assuma que um trecho de poli(A) de cinco pares de bases produz um enovelamento de 20° em uma cadeia de DNA. Calcule o enovelamento total (líquido) produzido no DNA se o par de bases do centro (o terceiro dos cinco) de dois trechos (dA)₅ sucessivos estiver localizado (a) a uma distância de 10 pares de bases; (b) a uma distância de 15 pares de bases. Assuma 10 pares de bases por volta na dupla-hélice de DNA.

5. Distinção entre estrutura de DNA e estrutura de RNA. Gramplos podem ser formados na sequência palindrômica de cadeia única de ambos RNA ou DNA. Qual é a diferença entre estrutura helicoidal de um grampo longo e completamente pareado (exceto na extremidade) no RNA e um grampo semelhante no DNA?

6. Química de nucleotídeos. As células de muitos organismos eucarióticos têm sistemas altamente especializados que reparam especificamente pareamentos incorretos G-T no DNA. O pareamento incorreto é reparado para formar o par de bases G≡C (não A=T). Esse mecanismo de reparo do pareamento incorreto G-T ocorre além de um sistema mais geral que repara quase todos os pareamentos incorretos. Sugira por que as células necessitam de um sistema especializado para reparar o pareamento incorreto G-T.

7. Desnaturação de ácidos nucleicos. Um oligonucleotídeo de duplex de DNA em que uma das cadeias tem a sequência TAATACGACTCACTATAGGG tem temperatura de fusão (t_m) de 59°C. Se um oligonucleotídeo de duplex de RNA de sequência idêntica (substituindo U por T) é sintetizado, a temperatura de fusão será mais alta ou mais baixa?

8. Dano espontâneo no DNA. A hidrólise da ligação N-glicosídica entre a desoxirribose e uma purina no DNA cria um sítio AP. Um sítio AP gera uma desestabilização termodinâmica maior do que a criada por qualquer pareamento incorreto no DNA. Esse efeito não está completamente elucidado. Examine a estrutura de um sítio AP (ver Figura 8-30b) e descreva algumas consequências químicas dessa perda da base.

9. Predição da estrutura de ácido nucleico a partir de sua sequência. Parte de um cromossomo sequenciado tem a sequência (em uma fita) ATTGCATCCGCGCGTGC GCGCGC-GATCCCGTTACTTTCCG. Qual parte dessa sequência é a mais provável de assumir a conformação Z?

10. Estrutura do ácido nucleico. Explique por que a absorção de luz UV pelo DNA de fita dupla aumenta (efeito hiper-crômico) quando o DNA é desnaturado.

11. Determinação de concentração de proteína em uma solução contendo proteínas e ácidos nucleicos. A concentração de proteína ou ácidos nucleicos em uma solução contendo ambos pode ser estimada pelo uso de suas diferentes propriedades de absorção de luz: proteínas absorvem mais intensamente em 280 nm e ácidos nucleicos em 260 nm. Estimativas de suas respectivas concentrações em uma mistura podem ser feitas medindo a absorbância (A) da solução a 280 e 260 nm e usando a tabela na próxima página, a qual dá $R_{280/260}$, a razão das absorbâncias a 280 e 260 nm, a porcentagem da massa total que é ácido nucleico e o fator, F , que corrige a leitura a A_{280} e dá uma estimativa mais correta de proteína. A concentração de proteína (em mg/mL) = $F \times A_{280}$ (supondo que a cubeta tenha um caminho óptico de 1 cm). Calcule a concentração de proteína em uma solução de $A_{280} = 0,69$ e $A_{260} = 0,94$.

$R_{280/260}$	Proporção de ácido nucleico (%)	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

12. Solubilidade dos componentes de DNA. Desenhe as seguintes estruturas e ordene suas solubilidades relativas em água (desde a mais solúvel até a menos solúvel): desoxirribose, guanina, fosfato. Como essas solubilidades são consistentes com a estrutura tridimensional do DNA de fita dupla?

13. Lógica do sequenciamento de Sanger. No método de Sanger (didesóxi) para sequenciamento de DNA, uma pequena quantidade de didesoxirribonucleotídeo trifosfato – como ddCTP – é adicionada à reação de sequenciamento junto com uma grande quantidade do correspondente dCTP. Qual seria o resultado esperado se o dCTP fosse omitido?

14. Sequenciamento de DNA. O seguinte fragmento de DNA foi sequenciado pelo método de Sanger. O asterisco vermelho indica um marcador fluorescente.



Uma amostra de DNA reagiu com a DNA-polimerase e com cada uma das misturas de nucleotídeos (em tampão apropriado) listadas abaixo. Didesoxinucleotídeos (ddNTP) foram adicionados em quantidades relativamente pequenas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

O DNA resultante da reação foi separado por eletroforese em gel de agarose e foram localizadas as bandas fluorescen-

tes. O padrão de bandas resultante da mistura de nucleotídeos 1 está abaixo. Supondo que todas as misturas fossem separadas no mesmo gel, qual seria a aparência das canais 2, 3 e 4?



15. Fosfodiesterase de veneno de serpentes. Uma exonuclease é uma enzima que cliva nucleotídeos sequencialmente a partir da extremidade de uma cadeia polinucleotídica. A fosfodiesterase de veneno de serpentes, a qual hidrolisa nucleotídeos a partir da extremidade 3' de qualquer nucleotídeo com um grupo 3'-hidroxila livre, cliva entre o 3' hidroxila da ribose ou da desoxirribose e o grupo fosforil do próximo nucleotídeo. Ela age no RNA ou DNA de cadeia simples e não tem especificidade de base. Essa enzima foi usada em experimentos de determinação de sequência antes do desenvolvimento de técnicas modernas de sequenciamento de ácidos nucleicos. Quais são os produtos da digestão parcial pela fosfodiesterase de veneno de serpente de um oligonucleotídeo com a seguinte sequência?



16. Preservação do DNA em endosporos bacterianos. Os endosporos de bactérias se formam quando o ambiente não mais permite o metabolismo celular ativo. Na bactéria de solo *Bacillus subtilis*, por exemplo, o processo de esporulação começa quando um ou mais nutrientes estiverem esgotados. O produto final é uma estrutura pequena e metabolicamente dormente que pode sobreviver quase que indefinidamente sem nenhum metabolismo detectável. Os esporos têm mecanismos que evitam o acúmulo de mutações potencialmente letais no seu metabolismo por períodos de dormência que podem ultrapassar 1.000 anos. Os esporos de *B. subtilis* são muito mais resistentes ao calor, à radiação UV e a agentes oxidantes (agentes mutagênicos), todos eles promovem mutações, do que a bactéria em crescimento.

(a) Um fator que evita potencial dano ao DNA é a grande diminuição no seu conteúdo de água. Como isso afetaria alguns tipos de mutações?

(b) Os endosporos têm uma categoria de proteínas denominada pequenas proteínas solúveis em ácido (SASP, do inglês *small acid-soluble proteins*), que se ligam ao DNA, evitando a formação de dímeros do tipo ciclobutano. O que causa a formação de dímeros de ciclobutano e por que os endosporos de bactérias necessitam de mecanismos que previnam a sua formação?

17. Síntese de oligonucleotídeos. No esquema da Figura 8-35, cada nova base a ser adicionada ao oligonucleotídeo que está sendo alongado é modificada de forma que o seu grupo 3' hidroxila é ativado e o grupo 5' hidroxila está ligado a um grupo dimetoxitritil (DMT). Qual é a função do grupo DMT na base que está sendo adicionada?

Bioquímica na internet

18. A estrutura do DNA. A elucidação da estrutura tridimensional do DNA ajudou os pesquisadores a entender como essa molécula carrega informação que pode ser fielmente replicada de uma geração para a próxima. Para ver a estrutura secundária do DNA de fita dupla, vá ao site do Protein Data Bank (www.pdb.org). Use os identificadores do PDB listados abaixo para ver os resumos da estrutura para as duas formas de DNA. Abra as estruturas usando Jmol (ligado ao *Display Options*) e use os controles no menu do Jmol (acessado com o *control-click* ou clique no logo do Jmol no canto inferior direito da tela do monitor) para completar os exercícios a seguir. Recorra ao *link* de ajuda do Jmol se necessário.

(a) Obtenha o arquivo da 141D, uma sequência de DNA altamente conservada e repetitiva da extremidade do genoma do HIV-1 (o vírus que causa a Aids). Mostre a molécula na forma de estrutura de esfera e bastão e os elementos em cores diferentes. Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada cadeia do duplex de DNA. Localize e identifique bases individuais. Identifique a extremidade 5' de cada cadeia. Localize o sulco maior e o sulco menor. Essa hélice está voltada para a direita ou para a esquerda?

(b) Obtenha o arquivo da 145D, um DNA com a conformação Z. Mostre a molécula como na forma de estrutura de esfera e bastão e os elementos em cores diferentes. Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada cadeia do duplex de DNA. Essa hélice está voltada para a direita ou para a esquerda?

(c) Para avaliar precisamente a estrutura secundária de DNA, ver molécula na forma tridimensional. No *control menu*, escolha *Select > All*, então *Style > Stereographic > Cross-eye* ou *Wall-eye*. Você verá duas imagens da molécula de DNA. Coloque o seu nariz a aproximadamente 25 centímetros do monitor e olhe a ponta do seu nariz (com os olhos cruzados) ou as margens opostas da tela do monitor (com os olhos para os lados). No fundo você poderá ver três imagens da hélice de DNA. Mude o foco do olhar para a imagem do meio, que aparecerá em três dimensões. (Lembre-se que apenas um dos dois autores deste livro consegue fazer isso.)

Problema de análise de dados

19. Estudos de Chargaff da estrutura do DNA A seção do capítulo "DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética" inclui um resumo dos principais achados de Erwin Chargaff e seus colegas, listados como quatro conclusões ("Regras de Chargaff", p. 288). Neste problema, você irá examinar os dados que Chargaff coletou para sustentar essas conclusões.

Em um artigo, Chargaff (1950) descreveu seus métodos analíticos e alguns resultados preliminares. Resumidamente, ele tratou as amostras de DNA com ácido para remover as ba-

ses, separou as bases por cromatografia de papel e mediu a quantidade de cada base por espectroscopia de UV. Seus resultados estão mostrados nas três tabelas a seguir. A **relação molar** é a razão entre o número de moles de cada base na amostra pelo número de moles de fosfato na amostra – isso dá a fração do número total de bases representada por cada base específica. O *rendimento* é a soma das quatro bases (a soma das relações molares). A recuperação completa de todas as bases no DNA daria um rendimento de 1,0.

Relação molar no DNA de boi

Base	Timo			Baço		Fígado
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 1
Adenina	0,26	0,28	0,30	0,25	0,26	0,26
Guanina	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21	0,20
Citosina	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17	
Timina	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	
<i>Rendimento</i>	<i>0,88</i>	<i>0,94</i>	<i>0,94</i>	<i>0,84</i>	<i>0,88</i>	

Relação molar no DNA humano

Base	Esperma		Timo	Fígado	
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 1	Normal	Carcinoma
Adenina	0,29	0,27	0,28	0,27	0,27
Guanina	0,18	0,17	0,19	0,19	0,18
Citosina	0,18	0,18	0,16		0,15
Timina	0,31	0,30	0,28		0,27
<i>Rendimento</i>	<i>0,96</i>	<i>0,92</i>	<i>0,91</i>		<i>0,87</i>

Relação molar no DNA de microrganismos

Base	Levedura		Bacilo da tuberculose aviária
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 1
Adenina	0,24	0,30	0,12
Guanina	0,14	0,18	0,28
Citosina	0,13	0,15	0,26
Timina	0,25	0,29	0,11
<i>Rendimento</i>	<i>0,76</i>	<i>0,92</i>	<i>0,77</i>

(a) Com base nestes dados, Chargaff concluiu que "até agora nenhuma diferença foi encontrada na composição do DNA dos diferentes tecidos de uma mesma espécie". Isso corresponde à conclusão 2 mencionada neste capítulo. Entretanto, uma visão cética dos mesmos dados poderia concluir: com certeza, eles parecem diferentes! Se você fosse Chargaff, como usaria os dados para convencer algum cético a mudar de ideia?

(b) A composição de bases do DNA de células hepáticas normais e de células hepáticas cancerosas (hepatocarcinoma) não foi significativamente diferente. Você esperaria que a técnica de Chargaff fosse capaz de detectar uma diferença entre o DNA de células normais e o de células cancerosas? Justifique a sua explicação.

Como você pode imaginar, os dados de Chargaff não foram completamente convincentes. Ele continuou a aprimorar suas técnicas, como descrito no artigo posterior (Chargaff, 1951), em que ele descreveu relações molares de bases no DNA de vários organismos:

Fonte	A:G	T:C	A:T	G:C	Purina:pirimidina
Boi	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1
Humanos	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0
Galinha	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
Salmão	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Trigo	1,22	1,18	1,00	0,97	0,99
Levedura	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo c	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0
<i>E. coli</i> K-12	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0
Bacilo da tuberculose aviária	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1
<i>Serratia marcescens</i>	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9
<i>Bacillus schatz</i>	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0

(c) De acordo com Chargaff, como exposto na conclusão 1 neste capítulo, “A composição de bases do DNA geralmente varia de uma espécie para a outra”. Dê um argumento, com base nos dados apresentados até agora, que sustente essa conclusão.

(d) De acordo com a conclusão 4, “Em todos os DNA celulares, independentemente da espécie... $A + G = T + C$ ”. Dê um argumento, com base nos dados apresentados até agora, que sustente essa conclusão.

Parte da intenção de Chargaff foi refutar a “hipótese do tetranucleotídeo”. Essa era a ideia de que o DNA era um polímero monótono de tetranucleotídeos $(AGCT)_n$ e, portanto, incapaz de conter informação de sequências. Apesar de os dados apresentados anteriormente demonstrarem que o DNA não pode ser simplesmente um tetranucleotídeo – se fosse, todas as amostras teriam relações molares de 0,25 para cada base –,

ainda seria possível que o DNA de diferentes organismos fosse levemente mais complexo na forma de sequências repetidas, mas ainda monótono.

Para tratar dessa questão, Chargaff pegou DNA de germe de trigo e o tratou com a enzima desoxirribonuclease por diferentes períodos. Em cada intervalo de tempo, uma parte do DNA foi convertida a fragmentos pequenos, e os fragmentos grandes restantes foram chamados de “cerne”. Na tabela abaixo, o percentual de “19% do cerne” corresponde aos fragmentos grandes remanescentes quando 81% do DNA foram degradados; “8% do cerne” correspondem aos fragmentos grandes remanescentes após 92% de degradação.

Base	DNA intacto	19% do cerne	8% do cerne
Adenina	0,27	0,33	0,35
Guanina	0,22	0,20	0,20
Citosina	0,22	0,16	0,14
Timina	0,27	0,26	0,23
<i>Rendimento</i>	0,98	0,95	0,92

(e) Como você usaria esses dados para argumentar que o DNA de germe de trigo não é uma sequência repetitiva monótona?

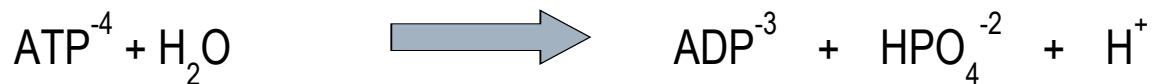
Referências

Chargaff, E. (1950) Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experimentia* **6**, 201-209.

Chargaff, E. (1951) Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* **10**, 654-659.

Quais as características estruturais da molécula do ATP responsáveis pela liberação de uma quantidade consideravelmente grande de energia livre, quando seu grupo fosfato-terminal é hidrolizado?

(i) **Grau de ionização do ATP** e de seus produtos de hidrólise. Em pH 7,0 o ATP está quase totalmente ionizado na forma iônica ATP^{-4} . Pela hidrólise ele libera três produtos: ADP^{-3} , HPO_4^{-} e H^+ conforme equação:



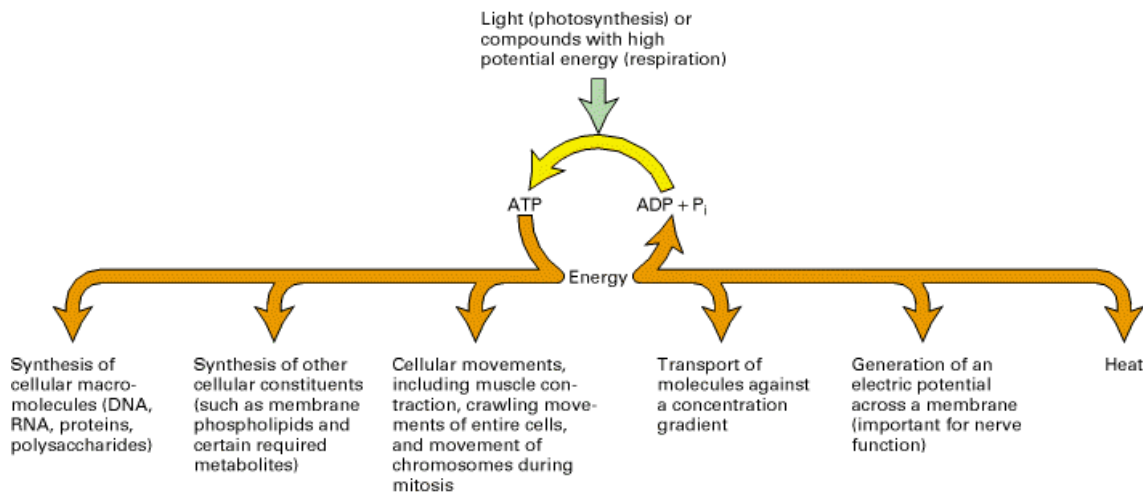
Nas condições padrão o ATP^{-4} , ADP^{-3} e HPO_4^{-2} estarão presentes em concentrações iguais a 1 M. Entretanto, em pH 7 (pH aproximado do citossol) a concentração do íon H^+ é apenas 10^{-7} M. Isso significa que pela **Lei do Equilíbrio Móvel de Le Châtelier** o equilíbrio da hidrólise do ATP é deslocado fortemente para a direita, pois a concentração de H^+ em pH 7 é muito baixa comparada com as concentrações padrão de 1 M dos outros componentes da reação.

Lei do Equilíbrio Móvel de Le Châtelier: “Quando um sistema em equilíbrio é perturbado, por variação de concentração, de pressão total, ou de temperatura, a alteração que nele se opera é de modo a reduzir o efeito imediato daquela perturbação”.

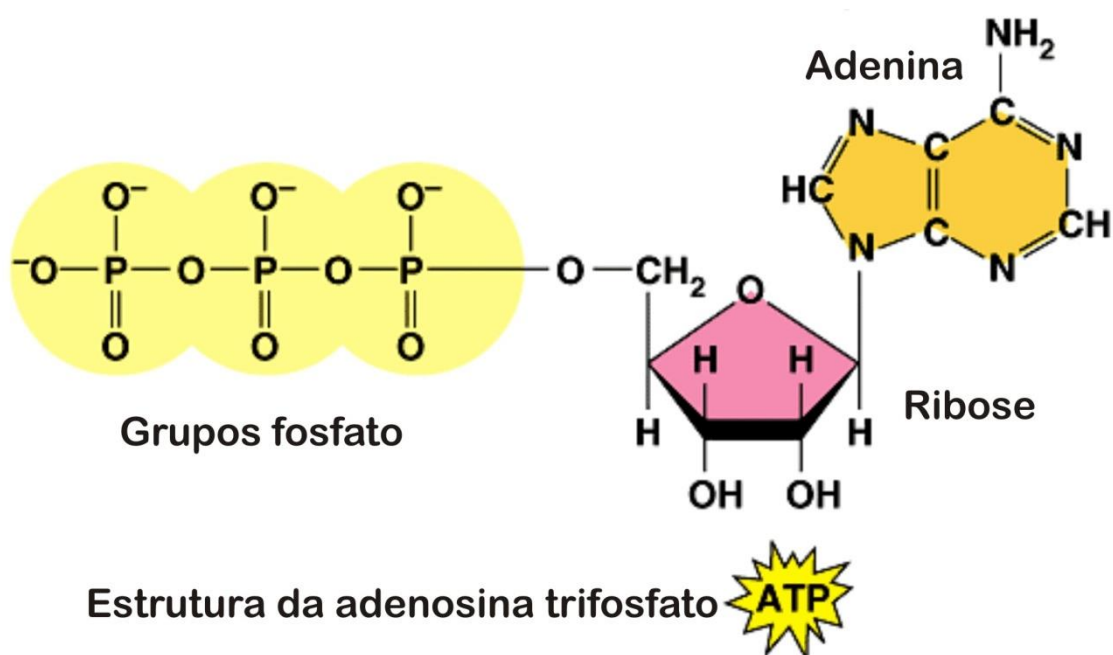
(ii) **Cargas do ATP**. Em pH 7,0 a molécula de ATP tem quatro cargas negativas muito próximas, e estas repelem-se fortemente. Quando a ligação do grupo fosfato terminal é hidrolizada parte da pressão elétrica no interior da molécula de ATP é aliviada pela separação dos produtos carregados negativamente ADP^{-3} e HPO_4^{-} . Estes produtos tem tendência relativamente pequena de aproximar-se e reagir em direção inversa, formando novamente ATP.

(iii) **Ressonância do ADP^{-3} e HPO_4^{-2}** . O ADP^{-3} e HPO_4^{-2} são híbridos ressonantes, formas especialmente estáveis nas quais certos elétrons estão em uma configuração que possui uma quantidade de energia muito menor que aquelas que possuíam em suas condições originais na molécula de ATP. Assim, quando o ATP é hidrolizado, os elétrons nos produtos podem cair para níveis energéticos menores que aqueles do ATP não hidrolizado.

Energia Celular. Para a manutenção e realização de suas diversas funções, as células vivas necessitam receber um suprimento de energia contínuo, de maneira ininterrupta, sendo que essa energia é proveniente da alimentação nos animais e do sol nos vegetais. No entanto, a mesma não é liberada subitamente, pois se isso ocorresse um indivíduo ao se alimentar se transformaria em "chamas". Na verdade as células de um organismo utilizam apenas a energia química, extraíndo-a dos aminoácidos, glicídeos, nucleotídeos e dos lipídeos contida nos alimentos ou nos produtos da fotossíntese. Esse processo de extração é lento, e ocorre em pequenas quantidades, reduzindo a perda de energia na forma de calor. Dessa forma, o organismo transforma energia térmica em energia química, disponibilizando essa última para o trabalho celular.

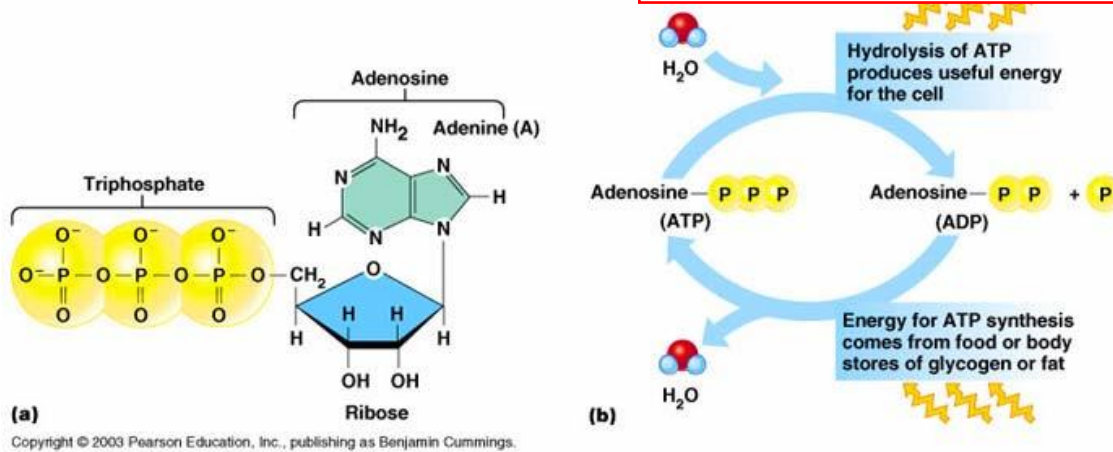


A maneira pela qual um organismo recolhe e conduz essa energia, e a torna disponível na forma de energia química, se dá através de um composto denominado ATP (trifosfato de adenosina), que funciona como um receptor-doador de energia. O ATP é o principal composto rico em energia, e é formado pelos nucleotídeos adenina e ribose (resultando em adenosina), ligados a 3 moléculas de fosfato (átomos de fósforo e oxigênio), unidos por ligações de alta energia.



A hidrólise do ATP libera uma molécula de fosfato formando um composto denominado de ADP (difosfato de adenosina), reação essa que libera aproximadamente 7,3 Kcal por molécula de ATP hidrolisado. Quando o ATP libera 2 moléculas de fosfato, forma-se o AMP (monofosfato de adenosina). A hidrólise do ATP ocorre com ou sem a disponibilidade de oxigênio, sendo essa uma reação rápida e anaeróbica. Esse processo permite a liberação de energia rápida para uso imediato, o que não ocorreria se o processo em questão fosse dependente do oxigênio.

Isto será melhor comentado do ponto de vista termodinâmico posteriormente. Estes raios saindo não transmitem a ideia de forma correta!



O ATP é armazenado em pequenas quantidades nas células e essa molécula não pode ser fornecida através do sangue, sendo que sua concentração está confinada a uma ressíntese contínua, que deverá ocorrer no mesmo ritmo com que essa molécula é utilizada.

A quantidade total de ATP no organismo encontra-se por volta de 80 a 100g, sendo suficiente para a manutenção de um exercício físico máximo por apenas alguns segundos. Nos momentos iniciais do exercício ou numa situação onde seja exigido uma contração muscular rápida e explosiva, onde as concentrações de ATP diminuem significativamente, a ressíntese de ATP ocorre a partir de outro composto de alta energia denominado CP (fosfato de creatina), sendo esse essencial durante a passagem de uma baixa para uma alta demanda energética.

A Química do ATP é bem conhecida

- Em pH 7,0, ATP e ADP ocorrem como ânions multicarregados: ATP^{-4} e ADP^{-3} , devido os grupos fosfato estarem ionizados nesse pH.
- No fluido intracelular, com grandes concentrações de Mg^{+2} , o ATP e ADP encontram-se geralmente na forma MgATP^{-2} e ADP^{-} .
- Em células normais, a concentração de ATP é praticamente constante, devido ao equilíbrio dinâmico estabelecido pela síntese e hidrólise do ATP. Assim, o grupamento fosfato terminal do ATP sofre remoção e reposição contínua durante o metabolismo celular.
- Quando o ATP sofre a perda de seu grupamento fosfato terminal por hidrólise, com formação de ADP