



TÓPICOS DE
GENÉTICA MOLECULAR

TEXTO: LUCIANA PAES DE BARROS MACHADO
ILUSTRAÇÕES: LARISSA MATEUS



Caros alunos,

Esse ebook é um pdf interativo. Para conseguir acessar todos os seus recursos, é recomendada a utilização do programa Adobe Reader 11.

Caso não tenha o programa instalado em seu computador, segue o link para download:

<http://get.adobe.com/br/reader/>

Para conseguir acessar os outros materiais como vídeos e sites, é necessário também a conexão com a internet.

O menu interativo leva-os aos diversos capítulos desse ebook, enquanto as setas laterais podem lhe redirecionar ao índice ou às páginas anteriores e posteriores.

Nesse *pdf*, o professor da disciplina, através de textos próprios ou de outros autores, tece comentários, disponibiliza links, vídeos e outros materiais que complementarão o seu estudo.

Para acessar esse material e utilizar o arquivo de maneira completa, explore seus elementos, clicando em botões como flechas, linhas, caixas de texto, círculos, palavras em destaque e descubra, através dessa interação, que o conhecimento está disponível nas mais diversas ferramentas.

Boa leitura!

SUMÁRIO



APRESENTAÇÃO

A Genética Molecular é uma ciência relativamente recente, com pouco mais de 60 anos, impulsionada com a publicação de Watson e Crick (1953) sobre a estrutura da dupla hélice do DNA e do aprimoramento de técnicas que permitiram acessar a variabilidade genética, primeiramente a partir do produto gênico, na década de 60 do século passado. A Genética Molecular está constantemente em inovação. Atualmente, com as novas tecnologias de sequenciamento de DNA, sequenciamento de última geração (*Next Generation Sequencing*) é possível conhecer o genoma inteiro de um organismo em poucas horas e estas informações trazem luz ao entendimento da variação dentro do genoma, entre genomas e entre linhagens.

Este *e-book* traz alguns tópicos sobre Genética Molecular que estão organizados de maneira a compreender a evolução da disciplina. Primeiramente, são abordados os temas referentes às características e propriedades dos ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico, DNA (nuclear e organelar, no caso dos organismos eucariotos), e o ácido ribonucleico, RNA. Os temas seguintes referem-se à mutação gênica, principal fonte de variabilidade, os mecanismos de reparo do DNA que impedem a fixação da mutação e as consequências das falhas no sistema. Nos tópicos finais são abordados alguns exemplos de regulação da atividade gênica em procariotos e eucariotos e a possibilidade de modificação transgênica de eucariotos: sua importância no estudo da função gênica, na agricultura e a polêmica em torno dos alimentos geneticamente modificados. O objetivo principal deste material é fornecer bases para o entendimento da origem da variabilidade genética, importante agente da evolução e, *a priori*, responsável pela diversidade biológica. Ao final de quase todos os capítulos é sugerido assistir um vídeo do YouTube sobre o tema abordado.

1 ÁCIDOS NUCLEICOS

1.1 INTRODUÇÃO

Os ácidos nucleicos são macromoléculas biológicas de alto peso molecular cujos monômeros que se repetem em sua constituição são os nucleotídeos, unidos por meio de ligações covalentes fosfodiéster. Todos os organismos apresentam dois tipos de ácidos nucleicos: ácido ribonucleico (RNA, sigla proveniente do inglês *Ribose Nucleic Acid*) e desoxirribonucleico (DNA, *Desoxyribose Nucleic Acid*). Alguns vírus contêm apenas RNA, enquanto que outros apresentam DNA.

1.2 FUNÇÃO

Existe uma correlação de função entre os dois tipos de ácidos nucleicos, pois o DNA é fonte de armazenamento da informação genética, que pode ser copiada, ou transcrita, nos diferentes tipos de RNA, RNA mensageiro (RNAm), RNA transportador (RNAt) e RNA ribossômico (RNAr). A este processo é dado o nome de transcrição, ou síntese de RNA, que será abordado no capítulo 6. A sequência de trincas de nucleotídeos do RNAm, por sua vez, é o código, ou códon genético, para as sequências de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica, ou seja, o código genético determina a estrutura primária da proteína. Este processo é denominado tradução, ou síntese proteica, e será detalhado no capítulo 7. Os outros tipos de RNAs, RNAt e RNAr, também participam do processo de tradução, sendo o RNAr constituinte de cerca de 50% da massa do ribossomo, organela onde ocorre a síntese proteica, enquanto o RNAt transporta o aminoácido correspondente ao código genético do RNAm para o aparato em que está ocorrendo a tradução (ver capítulo 7). Enquanto o

modelo para a síntese de RNA é a molécula de DNA, o próprio DNA serve de molde para a síntese de uma nova molécula de DNA, processo chamado de síntese de DNA, duplicação, ou replicação do DNA (capítulo 3). Esta série de fenômenos refere-se ao Dogma central da Biologia Molecular, resumido na Figura 1.1. Este dogma foi atualizado para eucariotos de maneira a reconhecer que a tradução de um RNAm resulta não apenas em uma única proteína, mas também em suas isoformas. Este evento é possível devido, principalmente, às etapas pós-transcrição de processamento do RNAm de eucariotos (capítulo 6).

Figura 1 - Dogma Central da Biologia Molecular



A molécula de DNA é molde para uma nova molécula (replicação), as regiões gênicas do DNA são modelos para a síntese de RNA, enquanto o RNAm carrega o código genético para a síntese proteica.

1.3 LOCALIZAÇÃO

Nos organismos procariotos, os ácidos nucleicos estão no citoplasma, o cromossomo bacteriano pode estar na forma de nucleóide e, ainda pequenos segmentos de DNA, podem se apresentar como plasmídeos circulares. Nas células eucarióticas, a maior

parte do DNA encontra-se no núcleo e uma pequena porção está presente nas mitocôndrias e cloroplastos (no caso de células vegetais) (capítulo 2), enquanto as moléculas de RNA são encontradas tanto no núcleo, onde são sintetizadas, quanto no citoplasma, onde ocorre a síntese proteica.

1.4 CONSTITUIÇÃO

Como mencionado anteriormente, os ácidos nucleicos são formados por monômeros de nucleotídeos, constituídos por um açúcar com cinco carbonos (pentose), bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) e ácido fosfórico. A combinação de uma base com uma pentose, sem o fosfato, constitui um nucleosídeo. Por exemplo, a adenina é uma base púrica, a adenosina (adenina + fosfato) é o nucleosídeo correspondente, ao passo que a adenosina monofosfato (AMP), difosfato (ADP) e trifosfato (ATP) são nucleotídeos. Essas definições são importantes também para ressaltar que os nucleotídeos apresentam outras funções na célula, como moléculas energéticas, além da composição dos ácidos nucleicos. Os nucleotídeos estão unidos na molécula de DNA por ligações covalentes, fortes, conhecidas como pontes fosfodiéster. A união de um nucleotídeo ao outro na molécula de ácido nucleico é estabelecida pelo carbono 3' da pentose de um nucleotídeo ao carbono 5' da pentose do nucleotídeo adjacente. Assim, o eixo de uma molécula de ácido nucleico é formado por fosfatos e pentoses alternados, e, perpendicularmente a esta estrutura, as bases nitrogenadas estão ligadas à pentose por meio de ligações N-glicosídicas (Figura 1.2). A carga negativa do ácido fosfórico é que confere a propriedade ácida dos ácidos nucleicos, permitindo que o DNA interaja com proteínas básicas, das quais muitas atuam na regulação da atividade gênica (capítulos 8 e 9).

Figura 2 - Constituição dos ácidos nucleicos

Nucleotídeos (pentose + fosfato + base nitrogenada) e ligação fosfodiéster entre o carbono 3' de um nucleotídeo e o carbono 5' do nucleotídeo adjacente. Os carbonos 3' e 5' livres (que não estão participando da ligação fosfodiéster) determinam as extremidades 3' e 5' dos ácidos nucleicos. A união entre a pentose e a base nitrogenada é estabelecida por ligações N-glicosídicas.

Até este ponto já é possível destacar duas diferenças entre os dois ácidos nucleicos: na pentose e nas bases nitrogenadas pirimídicas (Quadro 1). Na pentose do RNA o carbono 2' está ligado a um grupo hidroxila (-OH), enquanto no DNA, este mesmo carbono apresenta uma ligação apenas com hidrogênio (-H) na mesma posição. A diferença na pentose é que denomina os ácidos nucleicos como desoxirribonucleico – DNA (sem uma molécula de oxigênio no carbono 2' da pentose) e ribonucleico – RNA (com uma hidroxila no carbono 2' da pentose). As bases nitrogenadas são de dois tipos: purinas, constituídas por dois anéis heterocíclicos fusionados; e as pirimidinas, constituídas por um único anel heterocíclico. As bases púricas são as mesmas para o RNA e o DNA, Adenina (A) e Guanina (G), no entanto

existe diferença na constituição das bases pirimídicas entre essas moléculas. Ambos, DNA e RNA, possuem a pirimidina Citosina (C), mas Timina (T) é exclusiva do DNA, e Uracila (U) do RNA. Devido a esta diferença nas bases pirimídicas, é possível usar timina radioativa como marcador específico do DNA e uridina radioativa como marcador de RNA.

Quadro 1: Diferenças entre os ácidos nucleicos DNA e RNA quanto à constituição dos nucleotídeos



1.5 ESTRUTURA

Entre os anos de 1949 e 1953, o pesquisador Erwin Chargaff e colaboradores demonstraram que, embora a quantidade de bases nitrogenadas do DNA variasse de uma espécie para outra, a quantidade de adenina era sempre igual à de timina ($A = T$), assim como

o número de citosinas e guaninas também era o mesmo ($C = G$). Desta forma, estabeleceu-se a regra de Chargaff de que o número total de purinas é igual ao de pirimidinas (ou seja, $A + G = C + T$). Contudo, a relação AT/CG é muito variável entre as espécies (Tabela 1.2).

Quadro 2: Comparação da relação entre os pares de bases nitrogenadas AT/CG em humanos e procariotos (*Escherichia coli*).

	Humanos	Procariotos
AT/CG	1,52	0,93

Os valores indicam que os humanos apresentam mais pares AT do que CG, e esta relação é inversa em procariotos.

Após a descoberta da regra de Chargaff, e também de dados de pesquisa com difração de raio X (Wilkins e Randall, 1953), Watson e Crick (1953) propõem um modelo que explica não apenas a regularidade dos pares de bases na estrutura do DNA, como também é fundamental para o entendimento de sua duplicação nas células (capítulo 3). O DNA é constituído, portanto, de duas cadeias polinucleotídicas helicoidais, com giro para direita (na maioria dos casos), que são complementares e antiparalelas, ou seja, na posição de uma cadeia com a base A, na mesma posição da outra cadeia haverá um T; enquanto em uma das extremidades de uma cadeia o carbono livre é 3', na outra cadeia o carbono livre é 5', e a extremidade oposta seguirá a relação inversa (5' na primeira cadeia e 3' na outra). Cadeias antiparalelas do DNA significa que as pontes 3'-5'fosfodiéster seguem direções opostas. As bases nitrogenadas se encontram perpendicular a esta estrutura, havendo ligações entre as bases complementares das duas cadeias, como interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Entre os pares AT são estabelecidas

duas pontes de hidrogênio e três entre os pares CG (Figura 3 A). Essas interações entre as bases nitrogenadas das cadeias do DNA são ligações fracas, e são desestabilizadas com o calor. Dessa forma, a temperatura de desnaturação no DNA depende da relação AT/CG. A temperatura para desnaturar o DNA humano, por exemplo, é inferior à temperatura de desnaturação do DNA de *Escherichia coli* (Quadro 2), pois a bactéria tem maior proporção de pares CG em relação a AT, o que representa um número maior de pontes de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas e, assim, maior estabilidade do DNA, comparado ao de humanos.

O giro para a direita da molécula de DNA caracteriza a forma B, característica de situações celulares com umidade mais elevada. Assim, o DNA B, é o tipo encontrado mais frequentemente nas células. Outras formas são o DNA Z, com giro para esquerda, e DNA A que é uma forma experimental e menos hidratada da molécula e, por isso, menos condensada. O DNA Z ocorre em situações celulares de alta concentração de íons positivos, como sódio, os quais podem cobrir os grupos fosfatos carregados negativamente.

O RNA é constituído por uma única cadeia polinucleotídica, contudo não é uma estrutura linear simples. Esta molécula dobra sobre si mesma, formando alças, e estabelece pontes de hidrogênio entre pares de bases complementares, AU e CG e, muitas vezes, determinam ligação com outras bases como, por exemplo, G pode parear com C e também com U. O RNA apresenta formas distintas das bases nitrogenadas comuns, como a inosina, que pareia com qualquer uma das outras bases (Figura 3 B).

Neste ponto sobre a estrutura dos ácidos nucleicos, pode-se destacar mais uma diferença entre o DNA e o RNA, o RNA não segue a regra de Chargaff por ser constituído por uma única cadeia polinucleotídica, à exceção de alguns vírus que podem assumir a estrutura de RNA fita dupla.

1.6 ORIGEM

Qual das moléculas de ácido nucleico seria ancestral? A hipótese do mundo de RNA sugere que o RNA é a molécula primordial, que deu origem ao DNA. Essa hipótese baseia-se no fato do RNA apresentar tanto a função informacional, carregando o código genético para a síntese proteica, quanto a enzimática. As células atuais demonstram a função enzimática do RNA, a enzima peptidil transferase, que estabelece as ligações peptídicas entre os aminoácidos na síntese proteica (capítulo 7), é uma molécula de RNA; assim, como uma ribozima está envolvida no processamento do RNAm de eucariotos (capítulo 6). Segundo esta hipótese, mais tarde, no processo evolutivo, a função de informação genética é exclusiva da molécula de DNA que apresenta a capacidade de se autoduplicar (capítulo 3), enquanto o RNA é originado de um modelo de DNA (capítulo 6).

Sugestão de animação:

2 DNA EXTRANUCLEAR

2.1 INTRODUÇÃO

Nos eucariotos, cerca de 99% do material genético é encontrado no núcleo, enquanto 1% está no citoplasma no interior das mitocôndrias (DNAm), nas células animais, e nas mitocôndrias e cloroplastos (DNAcp), no caso das células vegetais. Os genes do DNA organelar codificam funções específicas das organelas, a produção de ATP por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e produção de ATP por fotossíntese, no caso do DNAcp.

A morfologia da mitocôndria e do cloroplasto apresenta, em comum, a presença de duas membranas, uma externa e a outra interna, mais invaginada. A invaginação da membrana interna da mitocôndria aumenta a superfície de contato e é onde está localizada a cadeia transportadora de elétrons. Além disto, esta membrana delimita a matriz mitocondrial, em que estão presentes DNAm e ribossomos. Nos cloroplastos, a membrana interna delimita o estroma, no qual é encontrado o DNAc, ribossomos e os tilacóides, local da reação de luz da fotossíntese.

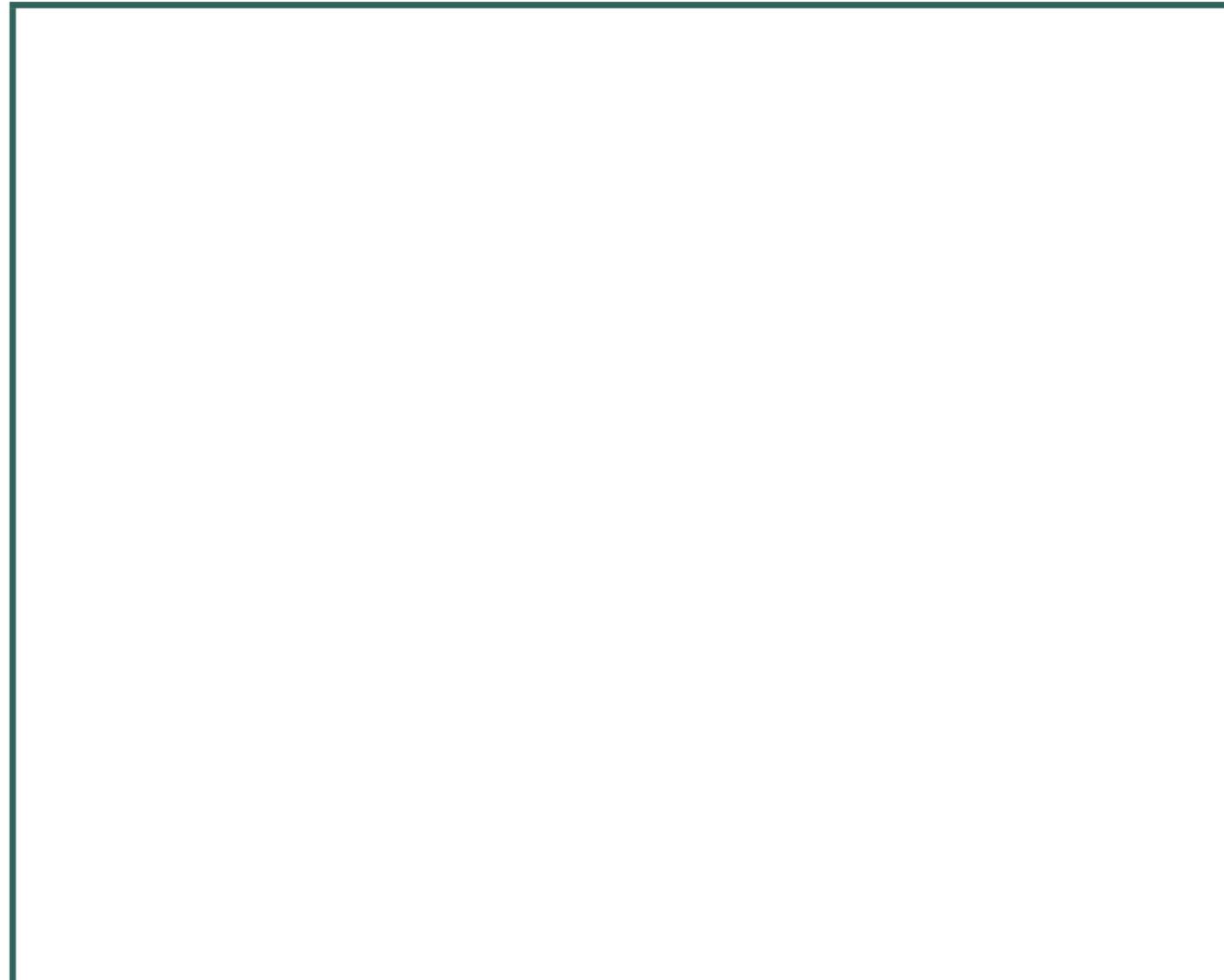
2.2 ORIGEM

A hipótese da endossimbiose é a teoria que acredita que as mitocôndrias e cloroplastos são organelas derivadas da interação entre um organismo procarioto ancestral aeróbio e um organismo eucarioto unicelular anaeróbio (Figura 4). O procarioto é englobado pelo eucarioto, e esta é a razão das mitocôndrias e cloroplastos apresentarem duas membranas. O evento de endossimbiose dos cloroplastos ocorre mais tardiamente que o da mitocôndria e acontece independentemente, por, ao menos, três vezes, visto a grande variedade de pigmentos fotossintéticos encontrados em algas e plantas. As mitocôndrias, por sua vez, são provavelmente derivadas de um tipo de bactéria fotossintetizante que perde esta capacidade de realizar fotossíntese, restando apenas a cadeia respiratória.

O que surge como uma simbiose opcional, nas formas de vida atuais esta é obrigatória. Muitos dos genes organelares passam para o genoma nuclear, de modo que as mitocôndrias e cloroplastos não são capazes de produzir todas as proteínas necessárias para executar suas atividades. Algumas proteínas, ou subunidades das proteínas/enzimas mitocondriais e cloroplastidiais são sintetizadas no núcleo e transportadas para as organelas, onde desempenharão suas funções. Existem poucas exceções de organismos

que sobrevivem sem as mitocôndrias e cloroplastos. *Sacharomyces cerevisiae*, por exemplo, consegue obter energia da fermentação, enquanto que algumas plantas sobrevivem como saprófitas, sem a função de fotossíntese dos cloroplastos.

Figura 4 - Esquema da origem por endossimbiose das mitocôndrias (A) e cloroplastos (B).



Note-se que B ocorre em período diferente de A. O evento B ocorre, independentemente, pelo menos três vezes no processo evolutivo.

2.3 COMPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS ORGANELARES E NUCLEARES

O quadro 2 apresenta as principais diferenças entre os cromossomos mitocondriais e nucleares, tendo como exemplo o genoma humano. Como mencionado no início deste capítulo, o genoma nuclear é muito maior que o organelar. Em geral, um gene encontrado no cromossomo organelar não está presente no genoma nuclear, ou está no genoma nuclear como um pseudogene (um gene que, devido ao acúmulo de mutações, não é funcional, apesar de apresentar alta similaridade de sequência com o gene funcional). Além do número de genes ser muito distinto entre o genoma organelar e o nuclear, outro fator que contribui para a diferença no tamanho entre estes genomas é que a maioria dos genes mitocondriais não possui íntrons (sequências dos genes que são removidas no processamento do RNAm – capítulo 6), ao contrário dos genes nucleares. Uma relação inversa é verificada nos genes mitocondriais de levedura que apresentam grande número de íntrons, enquanto a presença de íntrons no genoma nuclear de levedura é rara.

A maioria dos cromossomos organelares é circular, enquanto que os cromossomos nucleares são lineares. Ainda, apenas os cromossomos nucleares sofrem um processo de condensação contínuo que se inicia na prófase e atinge grau máximo na metáfase da divisão celular.

Uma célula haploide apresenta uma cópia de cada um dos cromossomos da espécie, já as mitocôndrias e cloroplastos têm um número variável de moléculas de DNA/organela. Ainda, o número de mitocôndrias e cloroplastos varia, dependendo do tipo celular, o que acentua, ainda mais, a diferença no número de cópias cromossômicas entre as organelas e os núcleos. Os ovócitos e células musculares esqueléticas de humanos apresentam milhares de mitocôndrias e cada uma delas contém dezenas de moléculas de DNA. Segmentos de cromossomos homólogos nucleares recombina-se durante a prófase I da divisão meiótica.

No entanto, não há recombinação entre as moléculas de DNA organelar. Existe um eficiente sistema de reparo de erros durante e após a replicação do DNA nuclear. Este mecanismo inexistente ou é muito ineficiente nas moléculas de DNA organelar.

A disciplina de Genética Geral aborda a segregação e os diferentes tipos de herança e interação entre alelos e genes dos cromossomos nucleares. Para o genoma organelar, contudo, a herança é basicamente materna no caso de organismos de reprodução sexuada. Isto acontece porque as células gaméticas femininas apresentam um número de mitocôndrias e/ou cloroplastos muito superior às células gaméticas masculinas, tornando irrisória a contribuição paterna de DNA organelar para o zigoto.

Quadro 2 - Comparação do genoma humano nuclear e mitocondrial.

	Nuclear	Mitocondrial
Tamanho	3 milhões de Kb e 100 mil genes	17 Kb e 37 genes
Estrutura	Forma – linear Condensação cromossômica	Forma – circular Sem condensação
Número de Cópias	1/célula haploide	Muitas cópias/célula
Recombinação/Reparo	Sim/Sim	Não há recombinação/Sem reparo ou ineficiente
Herança	Diferentes tipos (vistos na disciplina de Genética Geral)	Materna

Como inicialmente abordado na disciplina de Biologia Celular, a sequência de trincas de nucleotídeos do RNAm, códon ou código genético, determina a estrutura primária das proteínas e, na maioria dos casos, esses códons são os mesmos para todos os organismos (capítulo 7). Algumas das exceções à universalidade do código genético se aplicam às mitocôndrias (Quadro 3).

Quadro 3 - Diferenças no significado do códon entre os RNAs mitocondriais e nucleares.

Códons	RNAm mitocondrial	RNAm nuclear
AGA	Códon de parada	Arginina
AUA	Metionina	Isoleucina
UGA	Triptofano	Códon de parada

2.4 EXPRESSÃO DAS MUTAÇÕES DO DNA ORGANELAR

Como visto no item 2.3, Comparação dos cromossomos organelares e nucleares, existem milhares de moléculas de DNA organelar em uma única célula. Assim, uma questão interessante a responder é como uma mutação que surge em uma única molécula de DNA, dentre várias, tem sua frequência aumentada a tal ponto de apresentar um efeito fenotípico, ou seja, de se manifestar na célula. Para melhor compreensão das hipóteses que explicam tal aumento de frequência da mutação, vale ressaltar que o DNA organelar tem replicação independente da divisão celular, ou seja, há duplicação do DNA organelar mesmo em células terminalmente diferenciadas. São três as hipóteses, não totalmente excludentes, para explicar a expressão fenotípica de mutações no DNA organelar:

- 1) **mutações supressivas** – as mutações que ocorrem em uma molécula de DNA organelar também têm o efeito de duplicar a origem de replicação desta molécula. Com maior número de origens de replicação este DNA, com a mutação, tem uma taxa de replicação superior às moléculas não mutadas;
- 2) **deriva aleatória** – nesta hipótese a taxa de replicação das diferentes moléculas de DNA organelar é aleatória e tão variável que, em alguns casos, apenas o DNA mutado se replica, enquanto o tipo selvagem é completamente eliminado;
- 3) **mutações que reconhecem deficiência energética** – alguns tipos de mutações resultam, também, em um efeito de reconhecer potencial deficiência energética, de modo a se replicarem em maior frequência que as moléculas do tipo selvagem. Passado um certo limiar de frequência da molécula com mutação, a mitocôndria apresenta o efeito da mutação.

As hipóteses descritas explicam como a frequência de uma mutação que surge em uma única molécula de DNA organelar aumenta e expressa um efeito fenotípico na organela. Contudo, ainda permanece a questão de como uma organela, entre muitas, dependendo do tipo celular, com moléculas de DNA mutado, tem a frequência aumentada na célula para que esta apresente o efeito fenotípico da mutação. A segregação citoplasmática, divisão do citoplasma ao final da divisão celular, determina a expressão da mutação no DNA organelar em uma célula filha. Por exemplo, se o tipo mutante aumenta em frequência (de acordo com as hipóteses acima) em uma parte do heteroplasmon (um citoplasma com organelas contendo DNA com mutação e outra porção do citoplasma com organelas com DNA do tipo selvagem), é provável que esta área gerará células filhas constituídas apenas com organelas do tipo mutante ou com uma maior proporção de organelas com moléculas de DNA mutado.

Um exemplo da expressão de mutação no DNA de cloroplasto por segregação citoplasmática é o das plantas variegadas. Essas plantas apresentam manchas de tecido verdes e brancas (partes com DNAcp mutado, sem pigmento fotossintético, incapazes, portanto, de realizar fotossíntese), com ramos de folhas apenas verdes e outros apenas brancos. Estes ramos variegados produzem três tipos de ovócitos: somente com cloroplastos mutados (brancos), somente com cloroplastos do tipo selvagem (verdes), e com os dois tipos de cloroplastos. Após a fecundação dos ovócitos com ambos tipos de cloroplastos, nas divisões zigóticas subsequentes os cloroplastos brancos e verdes podem se segregar em algumas linhagens celulares, que devido à natureza clonal de divisão celular, também produzirá fenótipos variegados.

Figura 5 - Fenótipo de planta variegada *Alpinia zerumbet* 'Variegata'.



As porções mais claras e brancas das folhas são resultado de uma mutação no DNAcp, que impossibilita a síntese de clorofila

2.5 COMPARAÇÃO DAS TAXAS DE MUTAÇÃO ENTRE O DNA ORGANELAR E O NUCLEAR

Uma mutação, alteração em um ou poucos nucleotídeos do DNA, pode se fixar, ser transmitida para as próximas gerações, quando os mecanismos de reparo do DNA falham (capítulo 4). As taxas de mutação no DNA organelar de mamíferos são cerca de 10 vezes superiores às do DNA nuclear. Uma razão óbvia para isso está no fato de, DNA organelar não possuir mecanismo de reparo, ou este ser muito ineficiente, como apresentado no quadro 2. Além desta evidência, outras duas hipóteses não exclusivas, explicam as altas taxas de mutação do DNA organelar: o metabolismo das organelas gera grandes quantidades de radicais oxigênio, que resultam em danos oxidativos no DNA e, portanto, aumentam a taxa de mutação (capítulo 4) e a DNA polimerase responsável pela síntese do DNA organelar apresenta baixa fidelidade, aumentando os erros gerados durante a replicação e sem um sistema de reparo, ou reparo ineficiente, o resultado é o aumento da taxa de mutação.

3 REPLICAÇÃO DO DNA

3.1 INTRODUÇÃO

A replicação, ou duplicação, ou síntese do DNA ocorre no período S (de síntese) da intérfase período que antecede a divisão celular. Desta forma, quando a célula entrar em divisão, seu material genético (assim como todos os outros componentes celulares) já estará duplicado e as células filhas receberão moléculas idênticas de DNA. O processo de replicação do DNA é determinado por três características principais: semiconservativo; bidirecional e semidescontínuo. Nos tópicos seguintes são caracterizadas cada uma destas propriedades da replicação do DNA, assim como apontadas as funções das principais enzimas

envolvidas no processo. O esquema da Figura 6 resume as propriedades e as enzimas que realizam a replicação do DNA. O processo de replicação do DNA é muito complexo, suas etapas são desvendadas em maiores detalhes em procariotos, pois são organismos mais simples. Deste modo, a descrição das fases da replicação descrita a seguir é baseada em pesquisas realizadas em procariotos. As diferenças no processo, observadas em eucariotos, são destacadas ao longo do texto.

3.2 REPLICAÇÃO SEMICONSERVATIVA

Cada uma das duas cadeias polinucleotídicas do DNA (fita) serve de molde para a síntese de uma nova cadeia polinucleotídica. Assim, ao final da replicação, cada molécula de DNA está constituída por uma fita nova (recém-sintetizada) e pela fita que serviu de molde (fita parental). Na nova molécula, uma fita é conservada, a molde, e a outra é a recém-sintetizada, por isso a replicação do DNA é dita semiconservativa. Vale ressaltar que devido à complementariedade de bases entre as cadeias polinucleotídicas do DNA (capítulo 1), a fita nova de uma molécula de DNA é idêntica à fita molde da outra molécula e vice-versa.

3.3 REPLICAÇÃO BIDIRECIONAL

O processo de síntese de uma nova molécula de DNA não se inicia nas extremidades dos cromossomos de eucariotos nem em pontos aleatórios. Existem regiões específicas do DNA onde começa a replicação. O cromossomo circular de procariotos apresenta uma única origem de replicação, chamada de OriC, com cerca de 245 pares de bases, que, no momento da replicação, é reconhecida pela enzima DnaA. Esta enzima desestabiliza a ligação entre as bases nitrogenadas das duas fitas, gerando o que é chamado de bolha de replicação. A

partir da bolha de replicação, a síntese de DNA ocorre nos dois sentidos de cada fita, em direção à extremidade 3' e em direção à extremidade 5' da fita (capítulo 1), caracterizando a replicação bidirecional. Em eucariotos existem múltiplos pontos de origem de replicação, que geram várias bolhas de replicação, que se expandem, conforme segue a replicação, até que todas se encontram e a síntese de DNA é terminada.

A continuidade da abertura da dupla hélice, para o prosseguimento da duplicação, é realizada pela enzima helicase. Assim, a bolha de replicação inicial produzida pela DnaA, é convertida em uma forquilha de replicação, que se estende na molécula de DNA para ambos os lados. Essa enzima desenovela a dupla hélice quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases complementares nas duas cadeias, o que resulta uma certa tensão, uma torção na molécula de DNA à frente da ação da helicase. A enzima que evita esta torção, permitindo que a dupla fita continue sendo aberta, é chamada de DNA girase, ou topoisomerase. Como as bases das duas cadeias polinucleotídicas são complementares, logo apresentam atração uma pela outra. Desse modo, a função da helicase seria desfeita, após esta se deslocar adiante no DNA, não fosse a ação das proteínas de fita simples (a sigla SSP em inglês para *Single Strand Proteins*). Essas proteínas se ligam às duas fitas do DNA e não permitem o restabelecimento das pontes de hidrogênio e outras interações entre as bases das duas fitas moldes.

3.4 REPLICAÇÃO SEMIDESCONTÍNUA

A enzima responsável pela síntese da nova cadeia polinucleotídica na replicação do DNA é a DNA polimerase. Esta enzima é chamada de holoenzima por ser constituída por várias subunidades, sendo que três, α (alfa), ϵ (épsilon) e θ (teta), fazem parte de seu cerne catalítico. Em procariotos existem três tipos de DNA polimerase:

- DNA polimerase I, que tem função exonucleásica (degradar DNA) tanto no sentido 3'-5', como 5'-3', e também a função de polimerização (união de nucleotídeos) apenas no sentido 5'-3';
- DNA polimerase II, que atua no reparo do DNA caso haja a inserção errônea de uma base durante a replicação (outras exemplos de erros no DNA são discutidos no capítulo 4 deste e-book);
- DNA polimerase III é a enzima que sintetiza a nova cadeia polinucleotídica. Esta enzima requer nucleotídeos na forma trifosfato (ATP, TTP, CTP e GTP), pois a quebra das duas últimas ligações do fosfato fornece energia para a ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos, de modo que na constituição do DNA está presente apenas uma molécula de fósforo (capítulo 1).

Em eucariotos, foram descobertas ao menos cinco tipos de DNA polimerase, β e δ (delta), apresentam atividade semelhante à

DNA polimerase I de procariotos; β (beta) tem função no reparo e preenchimento de brechas do DNA; γ (gama) realiza a síntese do DNA mitocondrial; e ϵ também está envolvida no reparo do DNA.

A DNA polimerase tem uma propriedade muito importante que determina a característica semidescontínua da replicação do DNA, sintetiza a cadeia polinucleotídica apenas no sentido 5'-3', portanto, como as cadeias são complementares e antiparalelas (capítulo 1), faz a leitura da fita molde no sentido 3'-5'. Outra propriedade importante da DNA polimerase é que esta necessita de uma extremidade 3' livre para iniciar a síntese

do DNA. Essa extremidade é fornecida por iniciadores, chamados de primers, que são moléculas de RNA sintetizadas pela RNA polimerase na replicação contínua, e pela RNA primase (DNAG) na replicação descontínua. A RNA primase está ligada à helicase.

Desta maneira, quando o sentido da abertura da dupla hélice é o mesmo sentido de leitura da DNA polimerase, então a replicação é contínua, sem interrupções, a RNA polimerase sintetiza um primer, complementar à sequência de DNA imediatamente antes da ação da DNA polimerase e a replicação prossegue até o encontro da próxima forquilha de replicação. Contudo, se a abertura da forquilha de replicação segue o sentido inverso (5'-3'), a replicação é descontínua. A helicase abre um trecho da molécula de DNA, a RNA primase produz o primer e a DNA polimerase sintetiza DNA a partir do primer no sentido inverso ao da helicase. Assim, sucessivamente, a helicase abre um pouco mais a dupla hélice, a RNA primase sintetiza outro primer, a DNA polimerase sintetiza DNA até o primer produzido anteriormente.

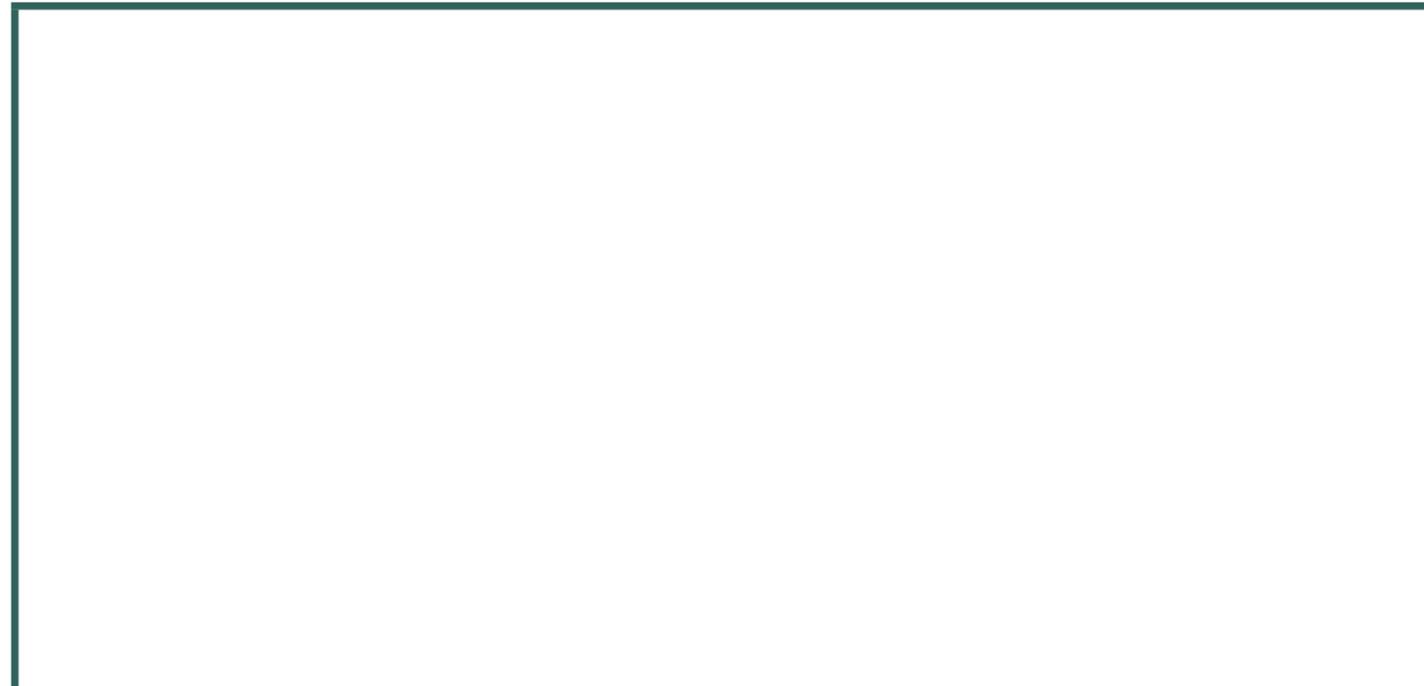
O primer de RNA sintetizado pela RNA primase mais o segmento de DNA produzido pela DNA polimerase constitui o fragmento de Okazaki, em homenagem ao pesquisador Reiji Okazaki que os descobriu. A replicação descontínua é, então, composta por diversos fragmentos de Okazaki, enquanto na replicação contínua existe apenas um primer de RNA, produzido pela RNA polimerase e a fita recém-sintetizada. Devido à bidirecionalidade da replicação, uma mesma cadeia polinucleotídica molde apresenta replicação contínua, no sentido de abertura 3'-5', e descontínua, a abertura da cadeia no outro sentido. A fita sintetizada no sentido de leitura da DNA polimerase é chamado de fita líder (*leading*, em inglês), enquanto a fita sintetizada no sentido oposto, descontínua, é chamada de retardatária (*lagging*, em inglês).

Os primers não fazem parte da nova molécula, pois os nucleotídeos não são os de DNA, e sim de RNA (veja as diferenças entre as moléculas de ácido nucleico no capítulo 1). Em procariotos, as enzimas DNA polimerase I e MF1 removem os primers da fita recém-sintetizada, enquanto a DNA ligase estabelece as ligações fosfodiéster entre os fragmentos após a remoção do primers.

As extremidades dos cromossomos, regiões teloméricas, são uma dificuldade à replicação do DNA. No sentido de replicação contínua, a síntese se inicia no primer produzido pela RNA polimerase e se estende até o final da fita. No entanto, no sentido de replicação descontínua, na extremidade o primer da RNA primase não funciona, permanecendo um trecho não polimerizado, o que resulta em um cromossomo encurtado. A região telomérica apresenta repetições em *tandem* (adjacentes) de sequências simples de DNA, TTGGGG, por exemplo, no protozoário ciliado *Tetrahymena*, e TTAGGG em humanos. Essas repetições não fazem parte de região codificadora do gene (capítulo 6), mas são importantes para a adequada replicação desta região.

A enzima telomerase carrega uma pequena molécula de RNA, complementar à sequência repetida em *tandem* dos telômeros, que serve de molde para a polimerização desta unidade de repetição e é adicionada à extremidade 3' da fita parental. A extensão da molécula parental, assim, não resulta em encurtamento do cromossomo quando a RNA primase não for mais apta a acrescentar primers para o término da replicação das extremidades cromossômicas. Algumas pesquisas demonstram que existe um encurtamento progressivo dos telômeros ao longo do ciclo de vida de uma célula, até a sua morte. Estas observações leram à proposição da teoria telomérica do envelhecimento, que relaciona o encurtamento da região telomérica, e consequente morte celular, com a perda da atividade da telomerase ao longo do tempo.

Figura 6 - Esquema da replicação do DNA



A partir da origem de replicação (OR), a síntese de DNA ocorre para os dois lados da molécula (nos sentidos 3'-5' e 5'-3' de cada fita) – replicação bidirecional. Quando o sentido de abertura da dupla hélice acompanha o sentido de leitura da DNA polimerase (3'-5'), a replicação é contínua. Quando o sentido de abertura da fita é oposto ao sentido de leitura da DNA polimerase (5'-3'), a replicação é descontínua, formando fragmentos de Okazaki (FO) – replicação semidescontínua. Ao final do processo de replicação, são geradas duas moléculas idênticas de DNA, cada uma constituída por uma fita molde e uma fita recém-sintetizada – replicação semiconservativa.

Sugestão de animação:

4 MUTAÇÃO E REPARO DO DNA

4.1 INTRODUÇÃO

As modificações hereditárias que ocorrem de um estado para outro no DNA são chamadas de mutação. A mutação envolve um pequeno número de pares de bases (mutação gênica), segmentos cromossômicos (mutações estruturais) e até mesmo envolve cromossomos inteiros (mutações cromossômicas numéricas do tipo aneuploidia) ou o conjunto cromossômico como um todo (mutações cromossômicas numéricas do tipo euploidia). Este capítulo tem como foco as mutações gênicas, em um pequeno número de pares de bases no DNA. A ocorrência de tais erros no DNA é uma tendência inerente às células, por isso o sistema de reparo dos erros é muito importante para garantir o funcionamento adequado das células. O reparo do DNA das células germinativas é importante na manutenção das espécies, enquanto o reparo das células somáticas o é para a manutenção do indivíduo, pois em última circunstância, erros não reparados no DNA das células somáticas resultam em câncer. Desta maneira, ao longo do processo evolutivo, surgem mecanismos muito eficientes de reparo do DNA. Ainda assim, alguns erros persistem e são repassados para as células filhas ou para a próxima geração, no caso de células germinativas, consistindo na taxa de mutação dos segmentos do DNA. A taxa de mutação, então, refere-se ao número de mudanças fixadas (que não foram corrigidas) em um determinado sítio da molécula de DNA em relação a uma unidade de tempo, que pode ser tanto período de replicação celular como tempo de geração, ou ainda tempo de divergência de um ancestral. Em outras palavras, a taxa de mutação é o resultado de um balanço entre a frequência de ocorrência de uma mutação e as falhas no mecanismo de reparo do DNA.

Quando, por exemplo, se compara determinada sequência gênica entre um par de espécie para estabelecer o ponto mutante, é preciso haver uma referência, no caso uma espécie mais ancestral. Nas mutações que resultam em alguma anomalia, o padrão é o tipo selvagem, que é a forma encontrada na natureza, ou estoques padrão de laboratório. Qualquer mudança do alelo do tipo selvagem é considerada uma mutação.

As mutações gênicas ocorrem espontaneamente ou são induzidas por agentes denominados de mutágenos. As mutações espontâneas são de ocorrência natural em todas as células, enquanto as mutações induzidas ocorrem na presença e em razão do agente mutagênico e são muito mais frequentes que as mutações espontâneas.

4.2 MUTAÇÃO ESPONTÂNEA

Mutações deste tipo surgem por diferentes causas, como erros na replicação do DNA, por lesões espontâneas nas bases nitrogenadas e, ainda, por elementos transponíveis. Os elementos transponíveis são segmentos de DNA capazes de se transpor de uma região à outra do genoma. Devido à importância desses elementos na evolução dos genomas e das espécies, esta causa de mutação espontânea é tratada, individualmente, no próximo capítulo.

4.2.1 ERROS NA REPLICAÇÃO

Uma das causas de erros gerados durante o processo de replicação são os tautômeros. Cada uma das bases do DNA apresenta uma variedade de formas, chamadas tautômeros, que são isômeros que diferem na ligação e posição de seus átomos. As formas ceto das bases nitrogenadas são as formas regulares do DNA, enquanto as formas imino e enol são mais raras. O erro acontece porque as formas alternativas das bases do DNA fazem pareamentos de bases ilegítimos. Por exemplo, o pareamento correto da guanina (G) é com a citosina (C), no entanto, a forma enol de G pode se parear erroneamente com

a timina (T). Este pareamento incorreto GT resulta em transição, que é a mutação de uma base púrica para outra ou de pirimidina para pirimidina, da seguinte maneira: se na fita molde está presente G enol, a DNA polimerase acrescenta, erroneamente, T na fita nova mas, mesmo assim, ocorre o pareamento entre as bases. Quando esta molécula nova de DNA que apresenta um par GT dá origem a uma outra molécula de DNA, no local de T cetona, neste novo ciclo de replicação, a DNA polimerase acrescenta uma adenina (A). Assim, do par original GC já está perpetuado o erro na molécula de DNA do segundo ciclo de replicação como par AT, ou seja, houve a mudança da purina (G) em uma fita para outra purina (A) e a alteração de C para T (pirimidina para pirimidina) na fita complementar.

Estes erros que resultam em mau pareamento da molécula de DNA podem ser reparados durante a replicação pela própria atividade exonucleásica (quebra nucleotídeo) 3'-5' da DNA polimerase. Como visto no capítulo anterior, as DNA polimerases I e III de *Escherichia coli* têm como uma de suas propriedades, reconhecer e remover uma base de pareamento errôneo na molécula que está sendo sintetizada.

Um outro mecanismo que corrige os erros de mau pareamento na molécula de DNA é chamado de reparo geral por excisão, em que não apenas a base mal pareada é removida da molécula de DNA, mas um pequeno fragmento, que circunda a base errada em questão. Esse mecanismo envolve três etapas:

- 1) excisão de segmento de DNA, de 12 a 13 nucleotídeos em procariotos e de 27 a 29 nucleotídeos de comprimento em eucariotos;
- 2) ressíntese: utilizando como molde a outra cadeia de DNA, a DNA polimerase preenche a brecha promovida na etapa anterior na molécula em que o erro foi detectado;

3) ligação, o DNA ligase une, estabelecendo a ligação fosfodiéster, os nucleotídeos das extremidades do fragmento corrigido.

4.2.2 LESÕES ESPONTÂNEAS

A depurinação, perda de purinas dos nucleotídeos é a lesão espontânea mais comum nas células. Este erro é causado quando ocorre uma quebra da ligação N-glicosídea (capítulo 1) entre a base nitrogenada e o açúcar do nucleotídeo e a consequente perda de uma adenina ou guanina no DNA (as bases púricas, capítulo 1). Quando uma base diferente da original é adicionada no sítio apurínico (AP), é gerada uma mutação. No entanto existem mecanismos eficientes de reparo deste tipo de erro. Um deles é a via de reparo por AP endonucleases, que são enzimas glicosilases. Essas AP endonucleases se ligam aos sítios apurínicos deixados após a depurinação espontânea, clivando as ligações fosfodiéster nestes locais e recrutando o reparo geral por excisão, mencionado acima: atividade de excisão de nucleotídeos pela atividade exonucleásica da DNA polimerase, ressíntese, também por outro tipo de DNA polimerase e ligação do fragmento corrigido ao restante da molécula de DNA pela DNA ligase.

Outra lesão espontânea frequente nas células é a desaminação, a perda de grupos amina (-NH₂) nas bases nitrogenadas. Todas as bases sofrem desaminação, com exceção da timina que não tem grupamento amina para perder. Quase toda desaminação possível no DNA produz uma base artificial que é reconhecida por uma glicosilase específica, que remove a base desaminada. A ação desta glicosilase específica gera sítios APs, desta vez, podendo ser apurínicos ou apirimidínicos, desencadeando o sistema de reparo por AP endonucleases e, em seguida, o reparo geral por excisão.

Um problema deste sistema de reparo de bases desaminadas é a metilação (inserção de grupamento metil $-CH_3$) de citosinas no DNA de vertebrados como um mecanismo de regulação da expressão de genes (capítulo 9). A falha ocorre porque uma citosina metilada e desaminada não origina uma base artificial no DNA, pois esta se converte em timina, base regular do DNA, enquanto uma citosina, sem metilação, desaminada é convertida em uracila, prontamente reconhecida pelo sistema de reparo como uma base estranha ao DNA. Assim, a citosina metilada e desaminada que se torna uma timina está pareada na cadeia complementar com uma guanina, formando um mau pareamento de bases. Existe um DNA glicosilase específico que reconhece este pareamento errôneo TG, remove e repara o T para C. No entanto, a ação da glicosilase passa a ser muito ineficiente, pois os segmentos de DNA com nucleotídeos citosinas metilados são chamados de pontos quentes (*hot spot*) de mutação. São pontos com alta frequência de mutação devido, principalmente, à falha no reparo das citosinas metiladas desaminadas convertidas em timinas.

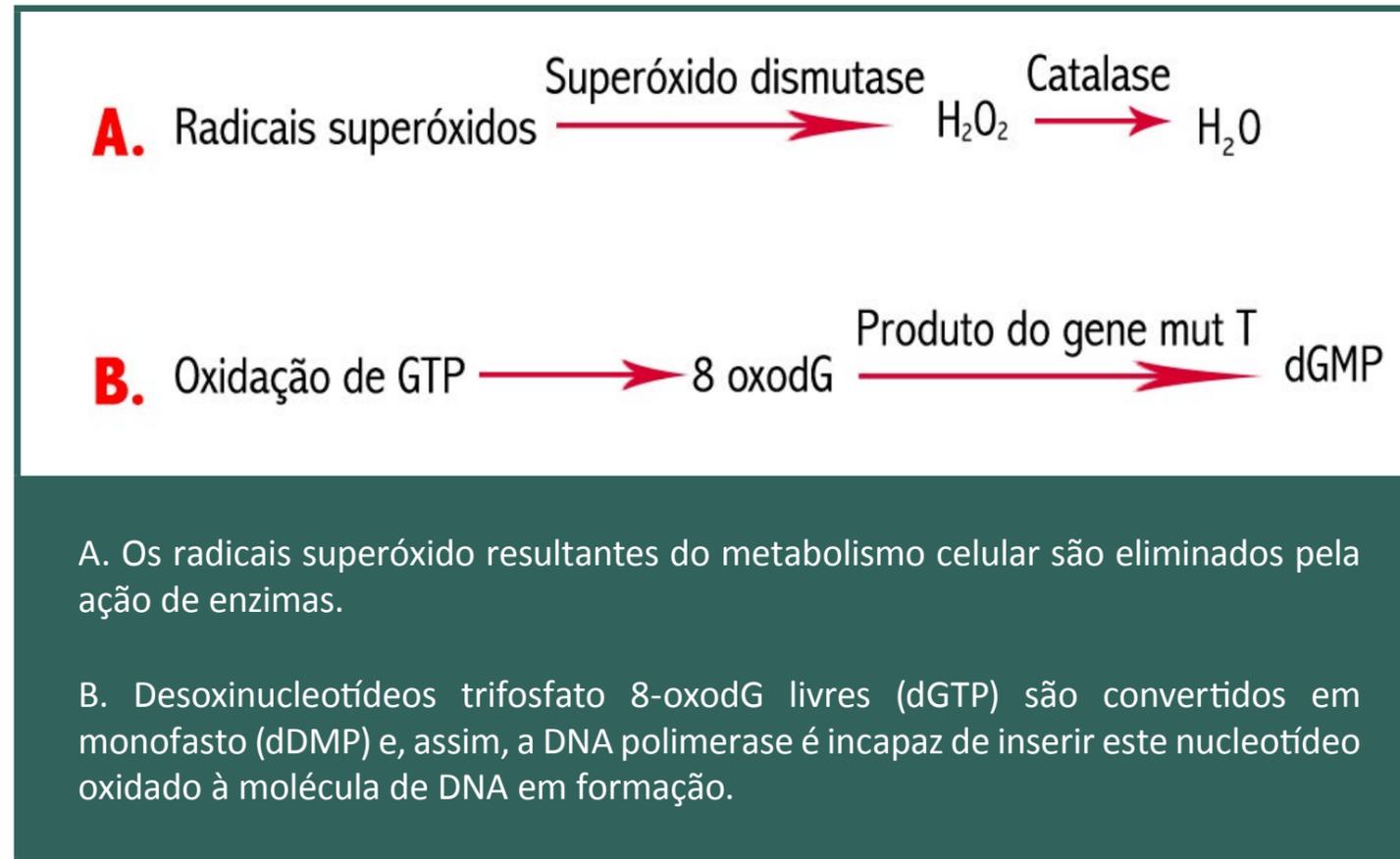
Também ocorrem lesões espontâneas no DNA por oxidação das bases nitrogenadas em virtude de radicais livres de oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e hidroxila ($-OH$), produzidos no metabolismo aeróbio celular normal. As bases nitrogenadas sofrem oxidação ainda na forma de nucleotídeo trifosfato, antes de serem incorporadas à molécula de DNA na replicação. As lesões mais frequentes decorrem da oxidação da timina, formando a timidina glicol, e da guanina, resultando em 8-Oxo-7-hidrodesoxiguanosina (8-oxodG), também chamada de lesão GO. A timidina glicol na fita parental, servindo de molde para uma cadeia de DNA que está sendo sintetizada, bloqueia a continuidade da replicação, pois não há base complementar a esta timina oxidada.

As lesões GO não reparadas, por sua vez, resultam em transversão (a substituição de uma purina por uma pirimidina e/ou vice-versa). Este tipo de mutação ocorre porque

a 8-oxodG estabelece pareamento com adenina e, se o molde para reparo desta guanina oxidada for a adenina, após a remoção da base com lesão, será acrescentada à molécula de DNA uma timina, convertendo G (purina) em T (pirimidina). As lesões GO são reparadas por DNA glicosilases específicas que reconhecem o mau pareamento GA, removem a guanina oxidada e acionam, assim, o reparo geral por excisão. Ainda um outro mecanismo que envolve o produto dos genes mut M e mut Y realiza a remoção direta de lesões GO. O produto do gene mut M reconhece e remove da molécula de DNA a 8-oxodG. Se este sistema falha, o produto do gene mut Y remove a adenina do mau pareamento da guanina oxidada e insere a base citosina do pareamento correto. A ação de mut Y tem dois efeitos, primeiro impede a transversão de G para T em um próximo ciclo de replicação do DNA e, ainda, possibilita que o produto do gene mut M tenha mais uma oportunidade para remoção direta da 8-oxodG.

Os compostos tóxicos produzidos no metabolismo celular podem ser inativados antes de causarem danos oxidativos no DNA ou nas bases nitrogenadas de nucleotídeos trifosfato livres que poderiam ser incorporados em cadeia de DNA em síntese. Esse reparo é chamado de reparo por detoxificação. Um mecanismo do reparo por detoxificação envolve a atividade de duas enzimas, primeiramente a superóxido dismutase converte os radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e depois a catalase converte este composto em água. O reparo por detoxificação também atua na conversão de um nucleotídeo 8-oxodG trifosfato livre na sua forma monofosfato, por meio da ação do produto do gene mut T (Figura 7). Como os nucleotídeos são requeridos na forma trifosfato para a síntese de DNA (capítulo 3), o nucleotídeo com lesão oxidativa, agora na forma monofosfato, não será inserido em uma molécula de DNA em formação, visto que a DNA polimerase necessita da quebra das duas últimas ligações do fosfato para produzir energia para a ligação fosfodiéster com o nucleotídeo da molécula de DNA crescente.

Figura 7: Mecanismos de ação do sistema de reparo por detoxificação que opera antes que o dano oxidativo atinja a molécula de DNA



4.3 MUTAÇÃO INDUZIDA

A ação de agentes mutagênicos no DNA resulta na substituição, mau pareamento e/ou dano às bases do DNA.

4.3.1 SUBSTITUIÇÃO DE BASE DO DNA

A 5-bromouracila (5-BU) é geralmente um mutágeno experimental, contudo também é usada no tratamento de neoplasias (crescimento anormal de tecidos). Este agente

mutagênico é um análogo da base timina (T), ou seja, quando este composto está presente nas células, a DNA polimerase insere 5-BU ao invés de T, em uma molécula de DNA em formação. O erro gerado por este análogo de base é que a forma ionizada de 5-BU estabelece pareamento errôneo com guanina (G), o que resulta, em um outro ciclo de replicação do DNA, em transição T para C, pois G na molécula molde determina uma citosina neste local na nova molécula. Durante a replicação, a fixação desta transição é evitada pela atividade de exonuclease da DNA polimerase, capaz de reconhecer o mau pareamento 5-BU/G, remover a base errada e acrescentar a correta, a adenina. Em caso de inoperância deste sistema durante a replicação, o reparo geral por excisão reconhece o mau pareamento, remove um segmento envolvendo a lesão e ressintetiza um novo pedaço corrigido.

4.3.2 MAU PAREAMENTO ESPECÍFICO

A nitroguanidina (NG) e o etilmetanossulfonato (EMS) não são análogos de bases, mas também causam danos por mau pareamento, por modificarem as bases nitrogenadas no DNA ou os nucleotídeos a serem inseridos nas moléculas de DNA em replicação. NG é muito utilizada como propelente para munição, em *airbags* e fertilizantes, enquanto EMS é um componente de medicamentos antirretrovirais. Ambos compostos são utilizados como mutágenos experimentais em pesquisas.

Estes agentes são mutagênicos por transferirem grupamentos acil (CH₃-CH₂) às bases nitrogenadas, e as bases assim modificadas realizam pareamentos incorretos que resultam em transições, as mais frequentes de pares GC para AT. As principais bases afetadas por NG e EMS são a guanina, que acilada é convertida em O-6-Etilguanina, e a timina, que sob efeito destes mutágenos resulta em O-4-Etiltimina. O-6-Etilguanina pareia com a timina, ao invés da citosina regular, resultando na transição GC para AT; a O-4-Etiltimina, por sua vez, estabelece pareamento incorreto com a guanina, originando transições TA para GC.

Os grupamentos acis das bases nitrogenadas podem ser removidos diretamente da molécula de DNA ou de nucleotídeos livres pela ação de enzimas aciltransferases, as quais transferem o agrupamento acil para um aminoácido cisteína da própria enzima. Outras formas de reparo das lesões envolvem a atividade de exonuclease da DNA polimerase, que identifica o pareamento incorreto gerado pela modificação das bases e o reparo geral por excisão.

4.3.3 BASE DANIFICADA

Alguns agentes mutagênicos danificam as bases nitrogenadas resultando em transições, transversões e/ou impedindo a replicação do DNA que não reconhece uma base complementar a ser inserida no local da lesão. Desta forma, a replicação não continua até que o erro seja reparado. Lesões desta natureza, então, exigem um reparo emergencial para que a replicação passe o erro e continue a polimerização de DNA após a parte danificada. Em bactérias, existe um mecanismo de reparo para lesões que impedem a continuidade da replicação do DNA chamado de sistema SOS. O reparo SOS consiste em inserir quaisquer bases aleatoriamente na fita que está sendo sintetizada para que a replicação continue. Esse sistema permite que a célula não seja eliminada, no entanto, às custas de um certo nível de mutagênese. Em eucariotos, as lesões que impedem a replicação do DNA são reparadas de forma mais eficiente pelo reparo de recombinação pós-replicação. Ao atingir a porção do DNA com a lesão, a DNA polimerase deixa uma brecha no local e continua a replicação a partir deste ponto. Após a replicação, esta brecha na fita recém-sintetizada é preenchida com o corte do segmento da outra fita parental, que é idêntico à fita nova com a brecha. O segmento de DNA cortado da outra fita parental, por sua vez, é sintetizado pela DNA polimerase, que utiliza como molde a fita recém-sintetizada a partir desta parental.

O agente mutagênico mais comum neste tipo de lesão é a luz ultravioleta (UV), encontrada naturalmente na radiação solar e artificialmente em lâmpadas. A luz UV ocasiona a

fusão dos anéis heterocíclicos de pirimidinas adjacentes na molécula de DNA, formando o que é chamado de fotodímeros, sendo o mais comum o fotodímero de timina. Estas lesões geram pareamentos incorretos de bases que, quando não reparados, resultam frequentemente em transições C para T, mas também em transversões. Em alguns eucariotos, como a mosca da fruta *Drosophila*, os fotodímeros são reparados diretamente pela ação da enzima fotoliase. No entanto, a atividade desta enzima é restrita à presença de luz, o que sugere que os mecanismos de reparo, descritos acima, sejam mais eficientes que a ação da enzima.

A radiação ionizante dos raios X e γ (gama) de aparelhos hospitalares, por exemplo, também danificam as bases do DNA e outros componentes celulares. Este tipo de mutágeno gera diferentes radicais oxigênio livres os quais, como discutido anteriormente, causam danos oxidativos no DNA e em nucleotídeos livres, além de causar a quebra das ligações N-glicosídicas, gerando sítios AP (apurínicos e apirimidínicos), e quebras no DNA. Para as quebras em segmentos do DNA não existe reparo. No entanto, os danos oxidativos são reparados pelo sistema de reparo por detoxificação, pela remoção direta de lesões com a ação dos produtos dos genes mut T e mut Y, descritos acima. Outros mecanismos de reparo para danos oxidativos e danos que resultam em sítios AP incluem os sistemas por excisão de bases por glicosilases e o reparo geral por excisão.

A aflatoxina B é outro exemplo de mutágeno que danifica as bases do DNA. Essa substância é um carcinógeno produzido por fungos que crescem em grãos, cujo efeito no DNA das células é gerar sítiosapurínicos ou bases oxidadas. Um dos mecanismos de reparo destas lesões envolve o sistema SOS, que insere, preferencialmente, uma adenina nos sítiosapurínicos. Deste modo, se o sítioapurínico gerado contém uma guanina, este reparo resulta em transversões GC para TA. Os outros mecanismos de reparo dos danos gerados pela aflatoxina B são os mesmos já descritos para sítiosapurínicos e oxidação de bases:

reparo por detoxificação, remoção direta de lesões GO pelos produtos dos genes mut T e mut Y, e reparo por excisão de bases por glicosilases/reparo geral por excisão.

O quadro 4, abaixo, resume os danos gerados à molécula de DNA, suas consequências e os possíveis mecanismos envolvidos no reparo dos erros. Os danos espontâneos causados por elementos transponíveis serão discutidos no próximo capítulo.

Quadro 4 - Principais danos espontâneos e induzidos na molécula de DNA, sistemas de reparo das lesões e consequências de falhas no sistema de reparo.

	Tipos	Consequências	Mecanismo de Reparo
Espontâneos	Erros na replicação		
	Ex.: mudança tautomérica	Pareamento errôneo – transição	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade de exonuclease da DNA pol (AEDNapol); • Reparo Geral por Excisão (RGE)
	Lesão espontânea		
	Ex.: Depurinação	Sítios AP – apurínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Reparo por Excisão de Bases por Glicosilase (REBG); • RGE
	Ex.: Desaminação	Transição	<ul style="list-style-type: none"> • REBG; • RGE
	Ex.: Oxidação de bases	Bloqueio da replicação; Transversão	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema de Reparo por Detoxificação (SRD); • REBG; • RGE; • Remoção Direta de Lesões GO (RDLGO)

	Tipos	Consequências	Mecanismo de Reparo
Induzidos	Substituição de bases no DNA		
	Ex.: 5-BU	Pareamento errôneo	<ul style="list-style-type: none"> • AEDNApol; • RGE
	Mau pareamento específico		
	Ex.: NG e EMS	Pareamento errôneo – transição	<ul style="list-style-type: none"> • Remoção direta de lesões por Aciltransferase; • AEDNApol; • RGE
	Base danificada		
	Ex.: Radiação UV	Transição/Transversão	<ul style="list-style-type: none"> • Fotoliase; • Reparo de recombinação pós-replicação; • Sistema SOS
	Ex.: Radiação ionizante	Dano oxidativo; Depurinação; Quebra – sem reparo	<ul style="list-style-type: none"> • SRD; • REBG; • RGE; • RDLGO
Ex.: Aflatoxina B1	Dano oxidativo; Depurinação; Transversão	<ul style="list-style-type: none"> • SRD; • REBG; • RGE; • RDLGO; • Sistema SOS 	

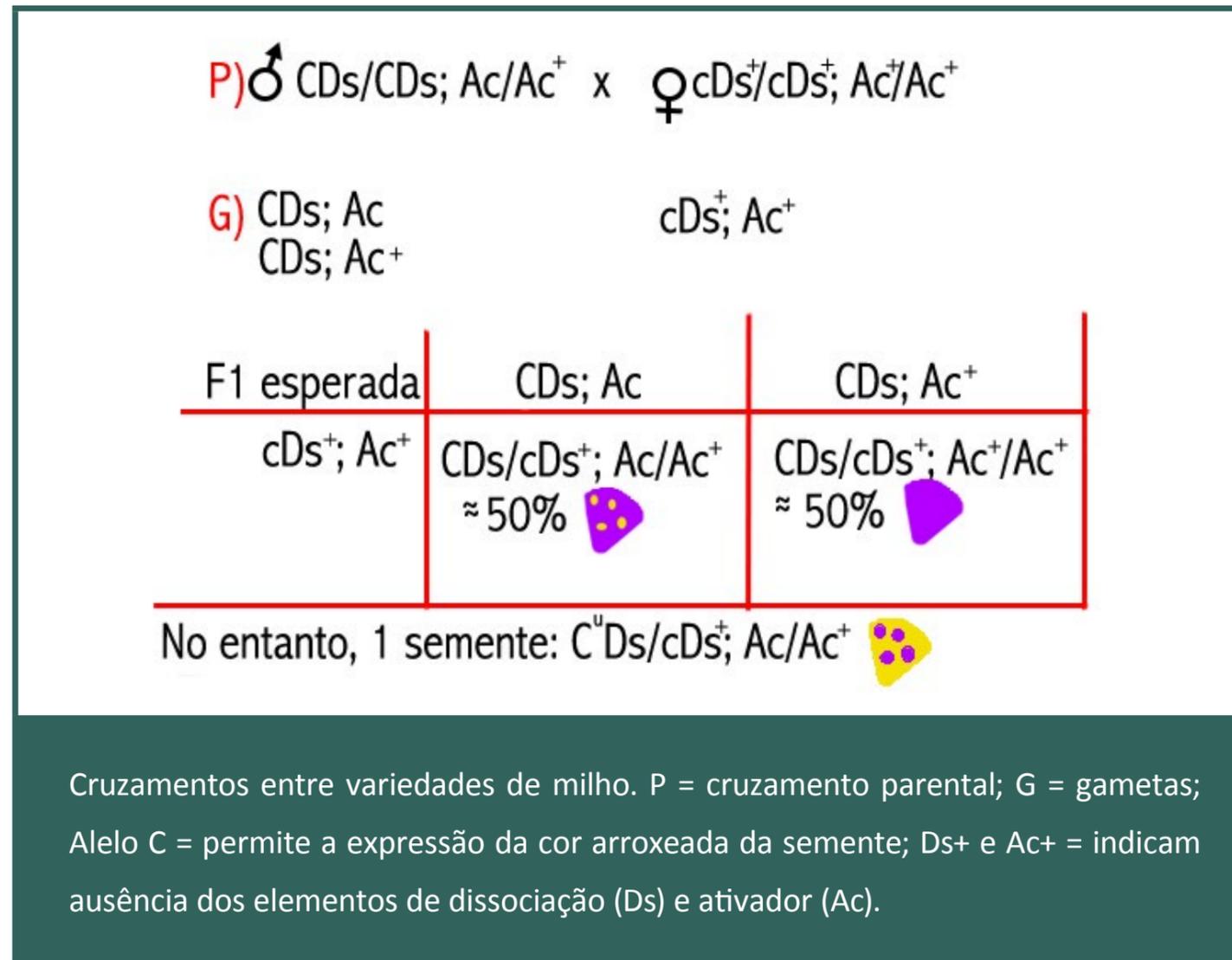
Sugestão de animação:

5 TRANSPONSON

5.1 INTRODUÇÃO

Os experimentos com milho realizados por Barbara MacClintock, na década de 1930, levaram à descoberta de que o genoma é instável. A ideia de um genoma em constante movimentação, no entanto, ficou desacreditada até as décadas de 60 e 70, quando o trabalho de Barbara é reconhecido e ela é, então, agraciada com o prêmio Nobel em 1983. Em seus experimentos, Barbara MacClintock encontra um elemento genético de dissociação, que nomeou de Ds, que causava quebra cromossômica no local em que se encontrava. A ação deste elemento Ds depende da presença de um outro gene, não ligado, Ac (Ativador). MacClintock supõe que, na presença de Ds e Ac, há quebra cromossômica no gene C, que permite a expressão da cor arroxeadada das sementes do milho, impedindo sua ação e gerando células sem pigmentação, clara. Durante o desenvolvimento da semente, o tamanho das manchas depende de quando a quebra no gene C ocorre, ou seja, quanto mais no início do desenvolvimento, maior a área sem pigmentação, devido à natureza clonal da divisão celular. Os experimentos realizados por Barbara MacClintock envolvem o seguinte cruzamento e progênie:

Figura 8 - Experimento de Barbara MacClintock



Como pode ser observado nos resultados dos experimentos descritos na Figura 8, uma semente, entre milhares, apresenta fundo claro, com manchas roxas. O fenótipo desta semente não é explicado por quebra cromossômica, pois se o fundo não apresenta pigmentação significa que a quebra cromossômica ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente e uma quebra não é reestabelecida para explicar as manchas roxas. Estas manchas indicam que o gene C volta a se expressar. Assim, Barbara MacClintock

sugere que os elementos não ligados Ac e Ds não causam a quebra cromossômica, mas se movimentam no genoma, inserindo-se em regiões gênicas, perturbam o funcionamento do gene e depois transpõem-se para outra região, permitindo o funcionamento do gene novamente. A estes elementos foram dados os nomes de transposons, elementos transponíveis ou elementos genéticos móveis. No caso do experimento de MacClintock, Ac e Ds são transposons, mas apenas Ac apresenta a enzima transposase que permite que o elemento seja removido de uma região e transposto para outra. O fenótipo da semente com fundo claro e manchas roxas é causado pela transposição de Ds no gene C nas primeiras divisões celulares da formação da semente, o que impossibilita a expressão (cor) deste gene. Mais tarde, no desenvolvimento desta, em algumas células, o transposon deixa o gene C e, então, as células e as células filhas, passam a expressar a coloração, originando as manchas roxas. Um exemplo semelhante de mosaicismo de coloração por transposon é observado na flor conhecida popularmente como Boca-de-leão.

5.2 TRANSPOSON EM PROCARIOTOS

Após a descoberta de Barbara MacClintock, é determinado que os transposons estão amplamente distribuídos no genoma de uma diversidade de organismos, sendo muito importantes na transferência horizontal (aquela que não é por descendência) de genes de resistência a antibióticos em bactérias, por exemplo. Existe três classes de transposons em procariotos, que se movimentam pela ação da enzima transposase:

- elementos IS (do inglês Insertion Sequences), que significa sequências de inserção – apresentam sequências terminais invertidas que são adjacentes à transposase;

- transposons compostos (Tn) – são originados quando dois elementos IS se inserem muito próximos. Entre os elementos IS há genes de resistência a antibióticos. Assim, quando os transposons se movimentam, carregam o gene da resistência consigo. O processo de conjugação bacteriano, transferência de gene de uma célula doadora para uma receptora, encarrega-se da transferência horizontal da resistência entre procariontes da mesma espécie e até mesmo de espécie diferente;
- elementos TnA – caracterizados por apresentar repetições invertidas terminais de 38 a 40 pares de bases, maiores que as dos outros tipos de transposons. Estas repetições invertidas são adjacentes a três genes, tnpA (gene da transposase), tnpR (gene da resolvase – importante na transposição do elemento), e bla (gene de resistência à ampicilina).

O mecanismo de transposição em procariontes é de dois tipos: replicativo (uma cópia do elemento é gerada na transposição) e conservativo (não é produzida uma cópia do elemento transponível). Na transposição replicativa, uma cópia é deixada no sítio original e outra é gerada e transposta para outro plasmídeo. Ocorre, então, a fusão dos dois plasmídeos e pareamento entre as duas cópias. A enzima resolvase, produzida pelo gene tnpR, separa novamente os dois plasmídeos, cada um com uma cópia do transposon.

5.3 TRANSPOSON EM EUCARIOTOS

Os transposons são ainda mais disseminados no genoma de eucariotos do que de procariontes. Estima-se que de 25 a 40% do genoma de mamíferos e metade do genoma

do milho é resultado de processos de transposição ao longo da história evolutiva, e que cerca de metade das mutações espontâneas na mosca da fruta *Drosophila* é resultado de transposições. A capacidade destes elementos de se copiar e se transpor, inclusive de forma horizontal, confere rápida vantagem adaptativa em condições adversas, demonstrando a importância destas sequências na evolução dos genomas. No entanto, a presença de muitos transposons inibe a transposição de outros, de tal forma que, atualmente, a maioria dos transposons perderam a capacidade de se movimentar, permitindo que os organismos sobrevivam sem uma taxa de mutagenese extremamente danosa aos organismos.

Os transposons de eucariotos podem ser classificados em transposons e retrotransposons. Estes, por sua vez, são de dois tipos: elementos semelhantes a retrovírus, retrotransposons virais, e retroposons. A diferença entre os transposons e os retrotransposons é que os retrotransposons se transpõem por meio de uma molécula intermediária de RNA, como os retrovírus e os transposons por meio da transposase. Já a diferença entre os retrotransposons virais e os retroposons é estrutural, os retrotransposons virais apresentam regiões LTR (do inglês Long Terminal Region, que significa região longa terminal), enquanto os retroposons não apresentam estas regiões.

Exemplos de transposons já descritos são os elementos Ac e Ds do milho. Um outro exemplo de transposon bem estudado é o elemento P de *Drosophila*. Este transposon apenas é capaz de se movimentar em células germinativas. Em células somáticas, às quais estes elementos geram sérios danos, não é sintetizada a transposase, impossibilitando a movimentação do elemento. Quando, e somente neste caso, um ovócito sem elemento P (citoplasma M) é fecundado por um espermatozoide com elemento P (citoplasma P), os híbridos gerados são estéreis e com altas taxas de mutações, processo chamado de disgenesia híbrida. A disgenesia híbrida é causada devido à ativação do elemento P do

espermatozoide pelo citoplasma M. Uma vez ativados, estes elementos induzem mutações e quebra cromossômica. Os elementos P são recentes nas populações de *Drosophila*, pois estoques de laboratório de moscas coletadas antes da década de 50 do século passado não apresentam este transposon. O elemento P provavelmente se propaga entre as espécies de *Drosophila* por meio de um vírus natural.

Como exemplo de retrotransposon viral cita-se o elemento Ty (do inglês Transposon yeast, transposon de levedura) em levedura e o elemento L1, localizado no cromossomo 2 humano, que pode ser inserido, por replicação reversa, no gene do fator VIII, no cromossomo X. A transposição do elemento L1 nesta região do cromossomo X resulta em hemofilia, a incapacidade ou coagulação sanguínea ineficaz. Exemplos de retroposons são encontrados em *Drosophila*. São os retroposons associados ao telômero, HetA e TART (do inglês Telomerase Associated Retrotransposon, que significa retrotransposon associado ao telômero). Como visto no capítulo 3, existe perda da atividade da enzima telomerase, que faz a replicação da região telomérica ao longo do tempo, o que provoca o encurtamento dos telômeros e consequente morte celular. Contudo, este processo é mais raro em *Drosophila*, pois os dois retroposons se inserem na extremidade dos cromossomos, aumentando muito esta região. Assim, mesmo que haja falha na atividade da telomerase, novos transposons são preferencialmente inseridos nesta região, mantendo a estrutura dos cromossomos.

Sugestão de animação:

6 TRANSCRIÇÃO

6.1 INTRODUÇÃO

A transcrição, ou síntese de RNA, é passagem da informação genética dos genes do DNA para uma molécula de RNA. Apenas as regiões gênicas são transcritas em RNA, as demais regiões do DNA são conhecidas como DNA não codificante. Após a transcrição, se a molécula de RNA transcrita for do tipo mensageiro, ou seja, uma molécula de RNAm, ela será traduzida no produto final do gene que é uma proteína. A este processo é dado o nome de síntese proteica, ou tradução, que é abordado no próximo capítulo, fechando o denominado Dogma central da Biologia Molecular (capítulo 1). Todas as moléculas de RNA são sintetizadas pelo processo de transcrição, porém apenas o RNAm carrega o código genético para a tradução em proteína. Assim, nem todo produto gênico é uma proteína, pode ser apenas uma molécula de RNA. Relembrando os tipos de RNA descritos no capítulo 1:

- RNAm (RNA mensageiro), apresenta o códon ou código genético para a sequência de aminoácidos de uma proteína;
- RNAt (RNA transportador), carrega o anticódon de um aminoácido e transporta o aminoácido requerido ao ribossomo, organela em que ocorre a síntese proteica;
- RNAr (RNA ribossômico), constitui cerca de 50% da massa do ribossomo.

Os tipos de RNA exclusivos de eucariotos são:

- snRNA (do inglês small nuclear RNA, que significa pequeno RNA nuclear), tem função no processamento do RNA (ao final deste capítulo), sendo considerado uma ribozima (RNA com atividade enzimática);
- scRNA (do inglês small cytoplasmic RNA, que significa pequeno RNA citoplasmático), responsável por direcionar o tráfego das proteínas celulares.

6.2 ESTRUTURA DO GENE

Antes de começar a descrever o processo de transcrição é preciso entender a estrutura do gene. Como mencionado na introdução deste capítulo, um gene é uma sequência do DNA que carrega a informação para a síntese, uma molécula de RNA. Apenas uma das fitas do DNA da região gênica é transcrita em RNA, a outra fita é apenas complementar e não participa da transcrição. A região promotora do gene, aquela em que a enzima responsável pela transcrição, a RNA polimerase, reconhece e se liga ao gene, está sempre no sentido 3' da fita. Assim, o deslocamento da RNA polimerase na molécula de DNA se dá no sentido 3'-5', sintetizando, portanto, uma molécula de RNA que é complementar ao gene no sentido 5'-3'. Vale recordar que uma das pirimidinas do RNA é a uracila (U), ao invés da timina (T) do DNA, de modo que a purina adenina (A) do RNA faz pareamento com U, no lugar de T. Se um gene está em uma fita do DNA, o próximo gene pode estar tanto na mesma fita, como na fita complementar.

A região promotora do gene (extremidade 3') está localizada à cerca de 35 pares de bases da próxima região, a região codificadora, que é transcrita na molécula de RNA. Na região promotora dos genes, ligam-se diferentes proteínas que regulam, positivamente ou negativamente a expressão dos genes (capítulos 8 e 9), além dos fatores que auxiliam o processo de transcrição, os fatores de transcrição e a própria RNA polimerase, enzima fundamental para a transcrição. Na região promotora, a cerca de 10 pares de bases da região codificadora, está localizada a sequência conhecida como TATA box, que é reconhecida como sítio de ligação da RNA polimerase, caracterizada pela sequência TATAATG em procariotos e TATAAAT em eucariotos. Após a região promotora, está a região codificadora dos genes. Cada região codificadora é transcrita em uma única molécula de RNA, contudo, em caso de RNAm, esta molécula tem um RNAm multigênico, ou seja, que é traduzido em duas ou mais proteínas diferentes. Em seguida à região codificadora, na extremidade 5', a região finalizadora do gene contém o sinal para cessar a transcrição, que é dado por uma sequência de seis a oito timinas adjacentes, conhecida como região poli T.

Como mencionado, a enzima que transcreve a região codificadora do gene em uma molécula de RNA complementar é a RNA polimerase. Existe apenas um tipo desta enzima em procariotos e três tipos em eucariotos:

- RNA polI (RNA polimerase I), responsável pela síntese de RNAr 18S, 28S e 5,8S;
- RNA polII (RNA polimerase II), sintetiza RNAm;
- RNA polIII (RNA polimerase III), codifica RNAt, snRNA, scRNA, e RNAr 5S.

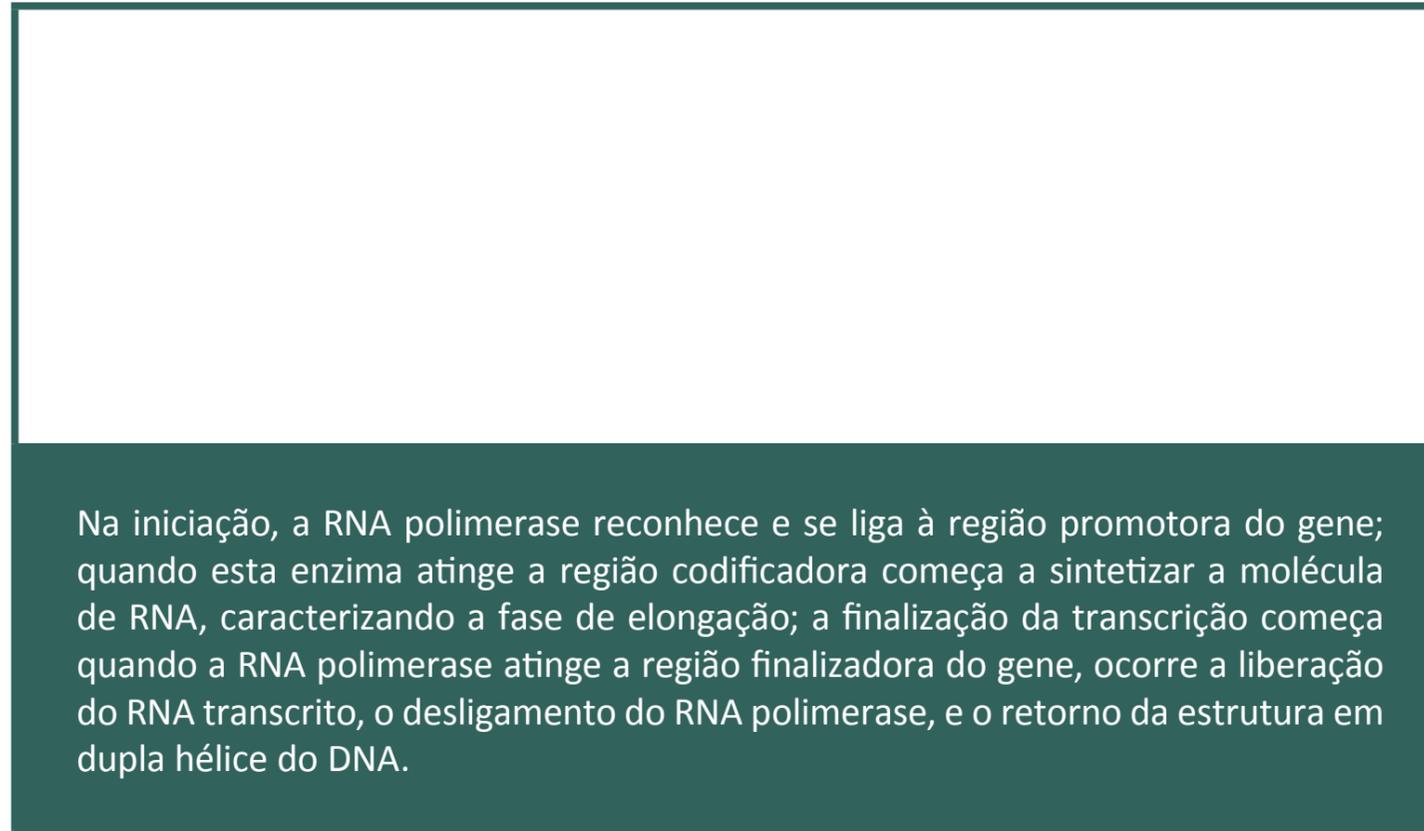
A RNA polimerase procariótica é constituída por uma subunidade β (beta), uma β' (beta prima), duas α (alfa) e uma σ (sigma). A união do fator sigma às outras subunidades desencadeia a fase de iniciação nos sítios promotores, descrita a seguir.

6.3 FASES DA TRANSCRIÇÃO

A transcrição, didaticamente, é dividida em três fases: a iniciação, a alongação ou alongamento, e a finalização ou terminalização (Figura 9). Esta separação é apenas didática, visto que o processo de transcrição é dinâmico.

Na fase de iniciação, a RNA polimerase reconhece a região promotora do gene, liga-se ao TATA box, auxiliada por fatores de transcrição como TBF e TFIIF, há o despareamento da cadeia de DNA em que a RNA polimerase está ligada, em procariotos ocorre a síntese de uma sequência curta de oligonucleotídeos com 2 a 9 pares de bases, que é então liberado. Outros fatores de transcrição impulsionam a RNA polimerase para a região codificadora do gene, configurando o início da fase de alongação da transcrição. Na região codificadora, a RNA polimerase transcreve o DNA em uma molécula complementar de RNA até chegar à sequência de poli T, na região finalizadora do gene, iniciando a fase de terminalização da transcrição. Em procariotos o término da transcrição é dado por um hexâmetro proteico, chamado de fator rho, que se desloca no RNA nascente até a região denominada *hair pin* (do inglês, que significa grampo de cabelo), sinalizando para a liberação do RNA recém sintetizado. O *hair pin* no RNA nascente é caracterizado por um trecho rico em GC, que permite que o RNA dobre sobre si mesmo e estabeleça pareamento entre essas bases, assumindo uma estrutura semelhante a um grampo de cabelo. Em resumo, ao final do processo de transcrição ocorre a liberação do RNA transcrito, a RNA polimerase se desliga da região finalizadora do gene e o DNA assume sua conformação original de dupla hélice.

Figura 9 - Fases da transcrição



6.4 PROCESSAMENTO DO RNAM DE EUCARIOTOS

Em procariotos, o RNAm é simultaneamente traduzido enquanto ainda está sendo transcrito. Já em eucariotos, o RNAm precisa ser processado (também o RNAt e RNAr) ainda no núcleo, onde foi sintetizado, antes de ser traduzido, no citoplasma. Uma das etapas do processamento do RNAm é a adição de uma guanosina metilada no carbono 7 (7MG) à extremidade 5' do RNA transcrito, determinando a extremidade cap, importante no reconhecimento do RNAm pelo ribossomo para o início da tradução (capítulo 7). Na extremidade 3' do RNAm, é adicionada uma cauda de poli A, cerca de 150 a 200 adeninas adjacentes. Na maioria dos casos, o tamanho da cauda de poli A inserida nesta etapa do

processamento, chamada de poliadenilação, determina a estabilidade do RNAm sendo, portanto, um mecanismo de controle pós-transcricional da expressão do gene (capítulo 9). Quanto maior a cauda, maior a estabilidade do RNAm, portanto, maior expressão do gene. Mas há exceção para esta regra.

O transcrito recém-sintetizado é composto por regiões de íntrons, segmentos do RNA que não fazem parte do transcrito maduro, e éxons, porções que determinam a sequência de aminoácidos das proteínas no processo de tradução, alternados. A etapa de recomposição do processamento do RNA, ou *splicing* (em inglês), consiste na remoção dos íntrons e a união dos éxons. Esta etapa do processamento envolve uma estrutura chamada de spliceossomo, que contém snRNAs, para esta remoção dos íntrons, e é também importante na regulação da expressão gênica. Alguns sítios para recomposição podem ser bloqueados no RNAm, resultando em moléculas ativas e inativas de RNAm, dependendo da maneira como a recomposição ocorre (capítulo 9). Esta alternatividade da recomposição também resulta em diferentes tipos de RNAs, provenientes de um mesmo gene, que são traduzidos em isoformas proteicas. A descoberta da recomposição altera, assim, o conceito de um gene, uma proteína, pois a recomposição alternativa dá origem a diferentes formas proteicas provenientes de um mesmo RNAm de um único gene.

A última etapa do processamento do RNA é a edição, em que novos nucleotídeos são inseridos, removidos, ou ainda modificados do RNAm transcrito. Existe intensa edição dos RNAm de genes mitocondriais do protozoário parasita *Trypanosoma brucei*, com a inserção de várias uracilas (U) em diferentes regiões do RNAm transcrito. Um exemplo de edição do RNAm em humanos é do RNAm da apolipoproteína-B, envolvida no transporte de lipídeos na corrente sanguínea. Existem duas formas desta proteína, uma mais longa, produzida pelas células do fígado, chamada de B-100, e uma mais curta, produzida pelas células do intestino, chamada B-48. Ambas as formas são produtos do mesmo gene, no

entanto, a forma mais curta, B-48, é resultado da edição do RNAm da apolipoproteína-B. A edição realizada neste caso é uma modificação de base, com a desaminação de uma citosina (C), que acaba sendo convertida em uracila (U), como visto no capítulo 4. Esta conversão de C para U, altera o códon CAA (do aminoácido glutamina) para UAA, que é um códon de finalização da tradução (capítulo 7), resultando em uma proteína intestinal mais curta e com propriedades bioquímicas ligeiramente diferentes da forma hepática mais longa.

Sugestão de animação:

7 TRADUÇÃO

7.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo finaliza o Dogma central da Biologia Molecular (capítulo 1) com a descrição do processo de tradução, ou síntese proteica. Apresenta-se como o codón genético no RNAm, caracterizado pelas trincas de nucleotídeos, é lido, traduzido na estrutura primária de uma proteína, ou seja, na sequência de aminoácidos desta. Isto significa que os aminoácidos são codificados pelos nucleotídeos organizados em trincas do RNAm.

Existem 20 aminoácidos na natureza, no entanto, com o código genético organizado em trincas de nucleotídeos, são possíveis 64 arranjos diferentes ($4 \text{ nucleotídeos combinados } 3 \text{ a } 3 = (4)^3 = 64$), o que ilustra uma das características do código genético: ele é degenerado. O códon degenerado significa que um mesmo aminoácido é codificado por diferentes trincas

de nucleotídeos. Além disso, existem trincas que não codificam qualquer aminoácido, mas são sinais de parada da tradução (Imagem1), são elas: UAA (denominado de códon ocre), UAG (códon âmbar), e UGA (códon opala). O códon do aminoácido metionina (Met), AUG, também é o códon que sinaliza a iniciação da tradução (Imagem 1). Em alguns casos, o códon GUG, e mais raramente UUG, também representam códons de iniciação da tradução.

Imagem 1 – O código genético.

		SEGUNDA BASE					
		U	C	A	G		
PRIMEIRA BASE	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	TERCEIRA BASE	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys		C
		Leu	Ser	Stop	Stop		A
		Leu	Ser	Stop	Trp		G
	C	Leu	Pro	His	Arg		U
		Leu	Pro	His	Arg		C
		Leu	Pro	Gln	Arg		A
		Leu	Pro	Gln	Arg		G
	A	Ile	Thr	Asn	Ser		U
		Ile	Thr	Asn	Ser		C
		Ile	Thr	Lys	Arg		A
		Met	Thr	Lys	Arg		G
	G	Val	Ala	Asp	Gly		U
		Val	Ala	Asp	Gly		C
		Val	Ala	Glu	Gly		A
		Val	Ala	Glu	Gly		G

Os códons de parada da tradução, UAA, UAG e UGA, estão representados com *Stop* na tabela (do inglês, que significa pare). É visualizado o caráter degenerado do códon, o aminoácido serina (Ser), por exemplo, é codificado por seis trincas diferentes (UCU, UCC, UCA, UCG, AGU e AGC).

Veja os códigos de abreviação dos aminoácidos:

Apesar do código genético ser degenerado ele não é ambíguo. Esta característica do códon significa que um determinado códon determina um único aminoácido e nenhum outro. Por exemplo, como foi destacado na Imagem 1, o aminoácido Serina (Ser) apresenta seis diferentes códons (códon degenerado), no entanto cada um dos seis códons não determina qualquer outro aminoácido além de Serina.

A terceira característica do código genético é que ele é universal, as mesmas trincas codificam os mesmos aminoácidos em todos os organismos. Este caráter permite o desenvolvimento das técnicas do DNA recombinante e transgenia (capítulo 10), pois o gene de uma bactéria, por exemplo, mesmo inserido em uma planta, produz a proteína bacteriana por meio da maquinaria de tradução da planta. Porém, para quase todas as regras há exceções, para alguns protozoários ciliados e RNAm de mitocôndrias (Quadro 5, já destacada no capítulo 2).

Técnica do DNA recombinante:

Quadro 5: Exceções à universalidade do código genético em protozoários ciliados e RNAm mitocondriais.

	AGA e AGG	AUA	UGA
Maioria dos organismos	Arginina	Isoleucina	Códon de parada
Protozoários ciliados e RNAm mitocondrial	Códon de parada	Metionina	Triptofano

O RNAt também participa do processo de tradução, com estrutura em forma de trevo (Figura 3B, capítulo 1) este RNA é responsável pelo transporte ao ribossomo do aminoácido correspondente ao códon do RNAm, apresentando na região de alça o anticódon, que é complementar e se pareia com o códon no RNAm.

O RNAr, por sua vez, participa como um componente estrutural da tradução, compondo 50% da massa dos ribossomos, a organela onde ocorre a síntese proteica. A outra metade da massa ribossomal é formada por proteínas. Os ribossomos são constituídos por duas subunidades, uma maior e outra menor, que apresentam índices de centrifugação em gradiente de sucrose diferentes (S) nos procariotos e eucariotos (Quadro 6).

Quadro 6: Constituição e índice de centrifugação em gradiente de sucrose (S) das subunidades ribossomais em procariotos e eucariotos

	Procarioto		Eucarioto	
	Subunidade menor	Subunidade maior	Subunidade menor	Subunidade maior
Constituição	21 proteínas + RNAr 16S	31 proteínas + RNAr 5S e 23S	33 proteínas + RNAr 18S	50 proteínas + RNAr 5S, 5,8S e 28S
S	30	50	40	60
Subunidades unidas	70S		80S	

As subunidades unidas apresentam um menor valor S do que a soma das duas subunidades separadas.

Quando não estão participando da síntese proteica, as subunidades ribossomais encontram-se separadas, apenas se unem ao final da fase de iniciação da tradução. As subunidades apresentam três sítios ativos:

- **sítio E** (do inglês *Exit*, que significa saída), que é o local em que o RNAt descarregado, sem o aminoácido correspondente ao seu anticódon, é liberado;

- **sítio P** (de Peptídeo), que é o local em que a enzima peptil transferase realiza a ligação peptídica entre os aminoácidos da proteína em formação;
- **sítio A** (de Amino-acil), para onde são trazidos pelos RNAts carregados com os aminoácidos correspondentes ao códon do RNAm.

O primeiro aminoácido a ser inserido é o correspondente ao códon de iniciação da tradução, AUG, referente à Metionina. Esta primeira Metionina é uma forma diferenciada das demais, chamada de N-formilmetionina, que é transportada para o sítio P do ribossomo, ao contrário dos demais aminoácidos, que são levados ao sítio A do ribossomo.

7.2 FASES DA TRADUÇÃO

Assim como o processo de transcrição (capítulo 6), a tradução, didaticamente, também é dividida em três fases: iniciação, alongação e terminalização. Em todas as etapas há alto gasto energético e, por isso, requer o intermédio de moléculas energéticas e de fatores de iniciação (IF, do inglês *Initiation Factor*), de alongação (EF, do inglês *Elongation Factor*) e liberação (RF, do inglês *Release Factor*), respectivamente.

A fase de iniciação é a mais distinta entre procariotos e eucariotos e as diferenças são destacadas a seguir. Já as demais etapas são semelhantes entre todos os organismos. Em procariotos, com o auxílio dos fatores de iniciação, a subunidade menor do ribossomo reconhece o RNAm a ser traduzido por meio do pareamento do RNAr 16S (Quadro 6) com uma sequência do RNAm, na extremidade 5', que é complementar ao RNAr da subunidade menor. Essa sequência recebe o nome de *Shine-Dalgarno* em homenagem aos cientistas que a descobriram. O ribossomo desloca-se no RNAm no sentido 5'-3' até que no sítio P da subunidade menor tenha o códon AUG de iniciação. O RNAt carregado com

N-formilmetionina, que apresenta a sequência UAC na região do anticódon, entra no sítio E do ribossomo, há o pareamento do códon AUG no RNAm com o anticódon UAC do RNAt carregado com N-formilmetionina e, então, a subunidade maior do ribossomo se junta ao complexo, finalizando a fase de iniciação da tradução em procariotos.

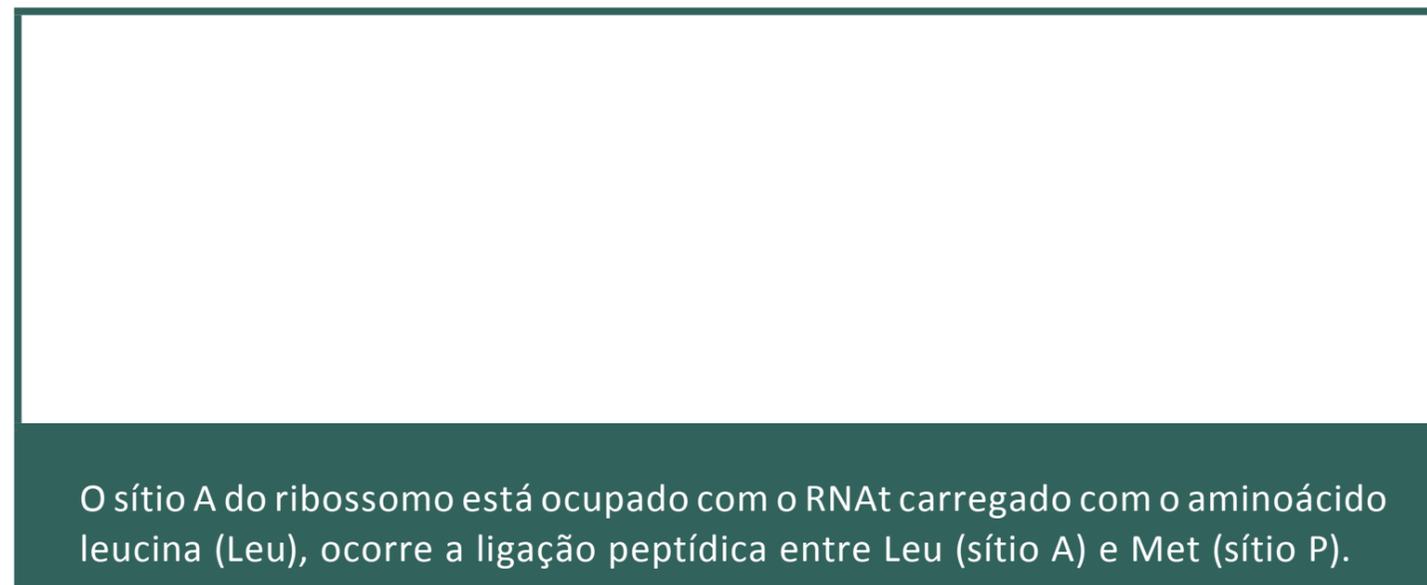
Na fase de iniciação da tradução de eucariotos, o RNAt carregado com N-formilmetionina entra no sítio P da subunidade menor do ribossomo, formando o que é chamado de complexo de iniciação 43S, que não tem o RNAm. O complexo de iniciação 43S (subunidade menor + RNAt carregado) reconhece o RNAm por meio da extremidade cap, acrescentada à extremidade 5' do RNAm no processamento do RNAm (capítulo 6). O ribossomo então se desloca no RNAm no sentido 5'-3' até que o sítio P esteja preenchido com o códon AUG de iniciação da tradução e ocorra o pareamento do códon do RNAm com o anticódon do RNAt carregado. A subunidade maior se junta ao sistema, concretizando a fase de iniciação da tradução em eucariotos. Todas estas atividades são mediadas por uma maior variedade de fatores de iniciação do que em procariotos.

Os fatores de alongação medem as etapas da alongação da tradução:

- **parte 1:** um RNAt, carregado com o aminoácido correspondente ao códon do sítio A do ribossomo entra neste local, chama-se, aqui, para fins didáticos, este aminoácido de aal;
- **parte 2:** há o pareamento entre códon e anticódon e é estabelecida a ligação peptídica, catalisada pela peptidil transferase, entre a N-formilmetionina, que está no sítio P (ainda na fase de iniciação), e aal do sítio A;
- **parte 3:** o ribossomo se desloca mais uma trinca em direção à extremidade 3' do RNAm.

Com o deslocamento do ribossomo, o RNAt descarregado da N-formilmetionina está agora no sítio E do ribossomo, o sítio P está ocupado agora com o RNAt carregado com aal (que estava no sítio A) ligado à N-formilmetionina e o sítio A agora apresenta mais um códon de aminoácido. Assim, as partes 1, 2 e 3 se repetem: um RNAt carregado com o próximo aminoácido correspondente ao códon do sítio A, aall, entra no sítio A; ocorre o pareamento do códon do RNAm com o anticódon do RNAt de aall, a peptidil transferase catalisa a ligação peptídica entre aal, no sítio P, e aall no sítio A; o ribossomo desloca-se mais uma trinca em direção à extremidade 3' do RNAm. Com este segundo deslocamento, o RNAt descarregado da N-formilmetionina que estava no sítio E do ribossomo, agora está fora do ribossomo; o RNAt do aal que estava no sítio P agora está no sítio E; o RNAt de aall que estava no sítio A agora está no sítio P juntamente com aall ligado a aal que, por sua vez, está ligado a N-formilmetionina; o sítio A agora apresenta um outro códon de aminoácido. As etapas 1, 2 e 3 se repetem até que o sítio A seja ocupado por um códon de parada da tradução, UUA, UAG e UGA, finalizando a fase de elongação da tradução (Figura 10).

Figura10 - Elongação da tradução



O ribossomo desloca-se uma trinca: RNAt de Met descarregado no sítio E, RNAt carregado de Leu ligado à Met no sítio P, e sítio A com RNAt carregado com o aminoácido lisina (Lys). O ribossomo desloca-se mais uma trinca: RNAt descarregado de Met fora do sítio E, sítio E ocupado pelo RNAt descarregado de Leu, sítio P com RNAt carregado de Lys ligado a Leu que, por sua vez, está ligado à Met, sítio A com o códon de parada da tradução, finalizando a fase de alongação e iniciando a terminalização da síntese proteica.

Na finalização da tradução, fatores de finalização reconhecem os códons de parada da tradução no sítio A do ribossomo, o peptídeo é liberado do sítio P, assim como os RNAts descarregados (um no sítio P e o outro no sítio E), e as subunidades menor e maior do ribossomo se dissociam.

Sugestão de animação:

8 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PROCARIOTOS

8.1 INTRODUÇÃO

A regulação da expressão gênica é muito importante para os organismos, pois se todos os genes fossem expressos ao mesmo tempo, em condições não requeridas, a atividade celular seria impraticável, devido ao tamanho do gasto energético desnecessário. Durante o curso evolutivo, diferentes mecanismos de regulação da atividade gênica são desenvolvidos. Os organismos procariotos, especialmente, requerem mecanismos rápidos

de controle da expressão gênica pois estão sujeitos a repentinas alterações em seu ambiente, enquanto os eucariotos superiores têm os efeitos de alterações súbitas controladas pelo sistema circulatório. Desta forma, os principais mecanismos que controlam a atividade gênica em procariotos são em decorrência de alterações a mudanças ambientais, enquanto em eucariotos o controle prevalecente envolve circuitos pré-programados, em que a ativação/repressão de um gene ativa/reprime a ativação de outros, em uma cascata de regulação da expressão gênica.

A maioria dos genes de procariotos são regulados no nível de transcrição. Existem proteínas ativadoras da atividade gênica, que acionam a transcrição (capítulo 6) e repressoras, as que reprimem a transcrição. As proteínas repressoras apresentam um sítio de ligação ao DNA e um sítio alostérico, ao qual se ligam moléculas efetoras. A seguir são descritos dois exemplos clássicos de regulação da expressão de genes em procariotos.

8.2 REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE TRIPTOFANO

O aminoácido Triptofano (Trp) é componente das proteínas de procariotos. No entanto, quando os organismos estão em ambiente rico neste aminoácido, como o intestino de um hospedeiro que acaba de se alimentar, a síntese do aminoácido não é necessária. Cinco produtos gênicos são necessários para a síntese de Trp e os genes estão arranjados continuamente com apenas uma região promotora antes deles, evidenciado que suas expressões são controladas conjuntamente. Na região promotora, depois do sítio de ligação da RNA polimerase para a transcrição, sítio P, tem uma região, chamada de sítio O (Operador), em que se liga a proteína repressora da síntese de Trp. Quando o repressor está ligado no sítio O, a RNA polimerase não consegue se ligar à região promotora do gene, não havendo a transcrição e, muito menos, a tradução deste grande RNAm multigênico, ou seja,

a proteína repressora impede a expressão do gene. Com Trp no meio, a proteína repressora tem alta afinidade ao DNA, pois o próprio Trp atua como uma molécula efetora que se liga ao sítio alostérico da proteína repressora, aumentando sua afinidade ao DNA, impedindo a transcrição, como descrito anteriormente. Contudo, na ausência de Trp no meio, a proteína repressora não tem a molécula efetora e perde a afinidade ao DNA, permitindo que a RNA polimerase realize a transcrição do RNAm que é traduzido nas proteínas responsáveis pela síntese de Trp. Assim, apenas quando o microrganismo não consegue obter o aminoácido Trp do meio é que sua síntese é requerida.

8.3 OPERON-LAC

As bactérias obtêm energia por meio de diferentes fontes de açúcar. O sistema *operon-lac*, que degrada o açúcar lactose apenas é ativo, expresso, quando há lactose no meio, e não há glicose. Se há glicose e lactose simultaneamente, a bactéria metaboliza a glicose ao invés da lactose, pois a degradação da glicose fornece mais energia à célula bacteriana que a lactose. Por isso, para a expressão do *operon-lac* não basta haver lactose, também não pode ter glicose.

A estrutura do gene do *operon-lac* é bem semelhante aquela dos genes de síntese de Trp, com uma única região promotora que controla a síntese de três genes, Z, Y e A, que são transcritos em um único RNAm multigênico. Apesar dos três genes serem regulados conjuntamente, apenas dois, os genes Z e Y, estão envolvidos no metabolismo da lactose. O gene Z tem como produto a β -galactosidase, que é a enzima que quebra a lactose; o gene Y, tem como produto uma permease que transporta a lactose para o interior celular, aumentando a entrada desta molécula energética na célula; já o produto do gene A é uma transacetilase sem qualquer relação com o metabolismo da lactose. A região promotora do *operon-lac* também apresenta o sítio P, de ligação da RNA polimerase e o sítio O, de

ligação da proteína repressora do *operon-lac*. Assim, o sistema *operon-lac* é constituído na sequência pelas regiões P, O, Z, Y e A.

A proteína repressora do *operon-lac* tem como molécula efetora, que se liga ao seu sítio alostérico, a lactose. No entanto, neste caso, diferentemente da síntese do Trp, quando a molécula efetora (lactose) está ligada à proteína repressora, esta perde sua afinidade de ligação ao DNA. Assim, na presença de lactose a proteína repressora não está ligada ao DNA, permitindo a ligação da RNA polimerase no sítio P e a expressão do sistema *operon-lac*, que realiza o metabolismo da lactose. Sem a lactose no meio, a proteína repressora está ligada ao sítio O, impedindo a transcrição do *operon-lac* pela RNA polimerase, quando este não é necessário (Figura 11).

Figura 11 - Regulação da expressão do sistema *operon-lac* em bactérias

A lactose é uma molécula efetora da proteína repressora do *operon-lac* que faz com que esta perca a afinidade ao DNA, permitindo a ligação da RNA polimerase no sítio P do DNA, ativando a expressão do *operon-lac*. Sem a molécula efetora, ou seja, na ausência de lactose, a proteína repressora no *operon-lac* liga-se no sítio O do *operon-lac*, impedindo que a RNA polimerase faça a transcrição do sistema.

A expressão do *operon-lac* também é impedida, como anteriormente mencionado, pela presença da glicose. A glicose impede a produção de cAMP (Adenosina monofosfato), AMP cíclico, por inibir a atividade da enzima adenilato ciclase, que converte ATP em AMP. O cAMP é um importante cofator da proteína CAP, que, por sua vez, se liga ao sítio P do *operon-lac*, sinalizando à RNA polimerase o local de ligação no DNA. Desta maneira, sem cAMP, devido à alta concentração de glicose no meio, a RNA polimerase perde a afinidade ao DNA, limitando a expressão do *operon-lac*. Esta inibição do *operon-lac* por altas concentrações de glicose é chamada de repressão catabólica.

Sugestão de animação:

9 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS

9.1 INTRODUÇÃO

Já foi enfatizado no capítulo anterior a importância dos mecanismos de regulação da expressão gênica para que a célula sintetize somente as proteínas necessárias àquele momento particular da célula e para adaptar-se, rapidamente, a uma mudança, nesta situação. Em eucariotos, a regulação da expressão gênica vai muito além, ela também é responsável pela diversidade de tipos celulares e tecidos especializados nos organismos. Considerando que todas células de um organismo têm o mesmo genoma, o que faz com que elas sejam tão distintas em morfologia e função? Boa parte da resposta à questão está na evolução de um intrincado e complexo mecanismo de regulação da expressão gênica em

eucariotos que permite que alguns genes são expressos em determinados tipos celulares e inibidos em outros. Esse sistema funciona como um circuito pré-programado de uma cascata de ativação e repressão da atividade gênica.

Os mecanismos de regulação da expressão gênica em eucariotos são muito mais complexos do que em procariotos, a começar pela quantidade de fatores de transcrição envolvidos no início do processo de transcrição e na quantidade de moléculas acentuadoras e silenciadoras da atividade gênica, que podem estar a vários kilobases de distância dos genes que estão regulando. Outra diferença marcante entre a regulação da expressão gênica em procariotos e eucariotos refere-se à atividade das proteínas repressoras. Em procariotos, as proteínas repressoras ligam-se ou não ao DNA em virtude da presença ou ausência de uma molécula efetora ligada ao sítio alostérico. Em eucariotos, as proteínas ativadoras e repressoras competem por um local de ligação ao DNA; proteínas ativadoras e repressoras ligam-se, simultaneamente, ao DNA. No entanto, a proteína repressora inibe a ação da ativadora; ou ainda a proteína repressora liga-se ao DNA nos estágios iniciais de união dos fatores de transcrição, impedindo que todos sejam ligados.

O mais importante mecanismo de regulação da expressão dos genes de procariotos é no nível de transcrição. Os genes de eucariotos apresentam vários casos de controle da atividade gênica, tanto no nível de transcrição, como pós-transcricional ou de tradução. A seguir são descritos alguns exemplos destes níveis de regulação da expressão dos genes eucarióticos.

9.2 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS

A própria estrutura da cromatina dos cromossomos é um mecanismo de regulação da expressão dos genes. Pesquisas demonstram que a maquinaria da transcrição consegue transpor o primeiro grau de compactação dos cromossomos, os nucleossomos.

Como visto na disciplina de Genética Geral, os nucleossomos são constituídos por um octâmero de proteínas histonas circundadas por quase duas voltas de DNA, sendo esta estrutura estabilizada externamente pela histona H1. No entanto, uma maior condensação cromossômica impede a transcrição de genes, assim muitas regiões gênicas sofrem um processo de heterocromatinização, cromatina altamente condensada, como um mecanismo para desativar estes genes. O cromossomo X das fêmeas de mamíferos é um exemplo deste tipo de regulação. Durante o desenvolvimento, um dos cromossomos X é heterocromatinizado, impossibilitando praticamente quase todos os genes de serem expressos. Em cada célula é aleatória a escolha do cromossomo X que será heterocromatinizado, se o X de origem paterna, ou o X de origem materna. O cromossomo X heterocromatinizado é visualizado em microscopia óptica como os chamados corpúsculos de Barr, nos núcleos das células, próximo ao envoltório nuclear. O processo de condensação e inativação do X começa em um sítio de nucleação, com a metilação de citosinas e se espalha a partir deste ponto, como uma cristalização, por quase todo o cromossomo.

9.3 REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS

O principal mecanismo de controle pós-transcricional da atividade gênica é a recomposição alternativa, ou *splicing* alternativo, em inglês. Este mecanismo é previamente apresentado no capítulo 6 deste e-book, como uma das etapas do processamento do RNA de eucariotos. A recomposição é a remoção dos íntrons, regiões não transcritas e união dos éxons, regiões transcritas, do RNA recém-sintetizado, dispostos, alternadamente, no RNA imaturo. Em alguns casos de regulação gênica, existe uma certa ambiguidade nas regiões intrônicas a serem removidas na formação do RNA maduro. Esta ambiguidade é aleatória ou regulada, tanto positivamente, quanto negativamente. Como já colocado no capítulo 6,

a descoberta da recomposição alternativa altera o conceito de gene, pois o produto de um RNAm não necessariamente é apenas uma proteína, mas também suas isoformas, geradas na recomposição alternativa de um mesmo RNAm.

O mecanismo de determinação do sexo em *Drosophila* exemplifica a regulação gênica por recomposição alternativa. Como visto em Genética Geral, a determinação do sexo na mosca da fruta se dá por meio da proporção de cromossomos X em relação ao número de conjuntos autossômicos (A). Assim:

- se X/A for igual a 0,5, há o desenvolvimento de machos;
- se $X/A = 1,0$, o resultado é uma fêmea;
- se $X/A < 0,5$, são originados indivíduos chamados de metamachos;
- se $X/A > 1,0$, caracteriza o desenvolvimento de metafêmeas;
- se $0,5 < X/A < 1,0$, o resultado são indivíduos intersexo.

Três genes estão envolvidos na determinação do sexo em *Drosophila*, *Sxl* – *Sex lethal* (do inglês, que significa sexo letal), *tra* - *transformer*, e *dsx* – *doublesex* (do inglês, duplo sexo). Na via de determinação dos machos ($X/A = 0,5$), os sítios de recomposição resultam em RNAm *sxl* e *tra* não funcionais e os sítios de recomposição no RNAm de *dsx* originam um RNAm, cujos códons finais são de cerca de 150 aminoácidos macho específicos e a proteína DSX tem como função reprimir os genes de diferenciação das fêmeas, permitindo o desenvolvimento de machos. Na via de determinação de fêmeas ($X/A = 1,0$), todos os RNAm (*sxl*, *tra* e *dsx*) são funcionais. Os sítios de recomposição do RNAm *sxl* de machos são bloqueados pela própria proteína SXL funcional, que tem uma tradução transitória ativada.

Esta recomposição diferente do RNAm *sxl* de fêmeas gera a proteína *SXL* funcional, cuja atividade é atuar como um bloqueador do sítio de recomposição do RNAm *tra* de macho. A recomposição alternativa do RNAm *tra* na via de determinação de fêmeas, permite a tradução da proteína *TRA*. A proteína *TRA*, juntamente com outra proteína, denominada *TRA2*, por sua vez, bloqueia o sítio de recomposição característico do RNAm *dsx* de macho. Assim, na via de determinação de fêmeas, a proteína *DSX* é composta por cerca de 30 aminoácidos fêmea-específicos na extremidade carboxila, que têm a função de reprimir os genes de diferenciação de machos, permitindo o desenvolvimento de fêmeas.

Uma outra etapa do processamento do RNA de eucarioto, que é também um mecanismo de regulação da atividade gênica, é a alteração do local de inserção da cauda de poli A na extremidade 3' do RNAm, da poliadenilação (capítulo 6). A síntese de anticorpos a serem secretados, ou que fazem parte da membrana dos linfócitos B, depende do local de inserção da cauda de poli A na extremidade 3' do RNAm. Existem dois códons de término da tradução no RNAm de anticorpos, um mais na metade da molécula e outro mais próximo da extremidade 3' do RNAm. Na recomposição do RNAm dos anticorpos que fazem parte da membrana plasmática dos linfócitos, o primeiro códon de finalização é também uma sequência intrônica, sendo removido do RNAm maduro. Além disso, a clivagem deste RNAm para inserção da cauda de poli A se dá mais próxima da extremidade 3' do que no RNAm de anticorpos a serem secretados. O resultado é que o RNAm de anticorpos a fazerem parte das membranas dos linfócitos produzem anticorpos de cadeias polipeptídicas maiores que os anticorpos secretados e com a extremidade carboxila hidrofóbica, que se posiciona na bicamada lipídica da membrana plasmática. Os anticorpos a serem secretados são menores, pois o primeiro códon de finalização não é removido neste RNAm. Além disso, a clivagem do RNAm para inserção da cauda de poli A ocorre logo após o primeiro códon de finalização da tradução. Assim, o segundo códon de finalização é removido do

RNAm maduro dos anticorpos a serem secretados. Os anticorpos a serem secretados dos linfócitos são caracterizados por apresentarem aminoácidos carboxi-terminais hidrofílicos.

O transporte do RNAm processado do núcleo para o citoplasma, em que ocorre a síntese proteica, depende, principalmente, da adequada adição da extremidade cap na extremidade 5' do RNAm, da adição da cauda de poli A na extremidade 3', e da remoção dos componentes do *splicing* (capítulo 6). Desta maneira, também o transporte do RNAm processado é alterado de modo a regular a expressão gênica, pois os RNAm retidos no núcleo não são traduzidos. Cerca de 50% dos RNAm transcritos são degradados ainda no núcleo, alguns são moléculas funcionais em um outro tipo celular. Muitas vezes o sucesso dos RNAm no citoplasma é bloqueado e, por isso, os RNAs são degradados.

9.4 REGULAÇÃO NO NÍVEL DE TRADUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS

Em alguns casos, mesmo o RNAm maduro transportado do núcleo para o citoplasma não é traduzido, dependendo do tipo e condições celulares. A localização do RNAm no citoplasma é muito importante para a ocorrência da tradução. Por exemplo, existem RNAm que são traduzidos por polirribossomos livres no citoplasma, enquanto outros são destinados à tradução por ribossomos presos à membrana do retículo endoplasmático rugoso. Assim, a adequada sinalização do destino da síntese proteica está sob o controle celular e quando ela não acontece, a atividade gênica é interrompida.

Os RNAm traduzidos e secretados do retículo endoplasmático rugoso têm a síntese iniciada em ribossomos livres. Assim que uma determinada sequência de aminoácidos amino-terminais emerge do ribossomo, chamada sequência sinal, esta é reconhecida pela proteína PRS (Partícula Reconhedora do Sinal) e a síntese proteica é interrompida. Todo o sistema (ribossomo, RNAm, peptídeo crescente, e PRS) são

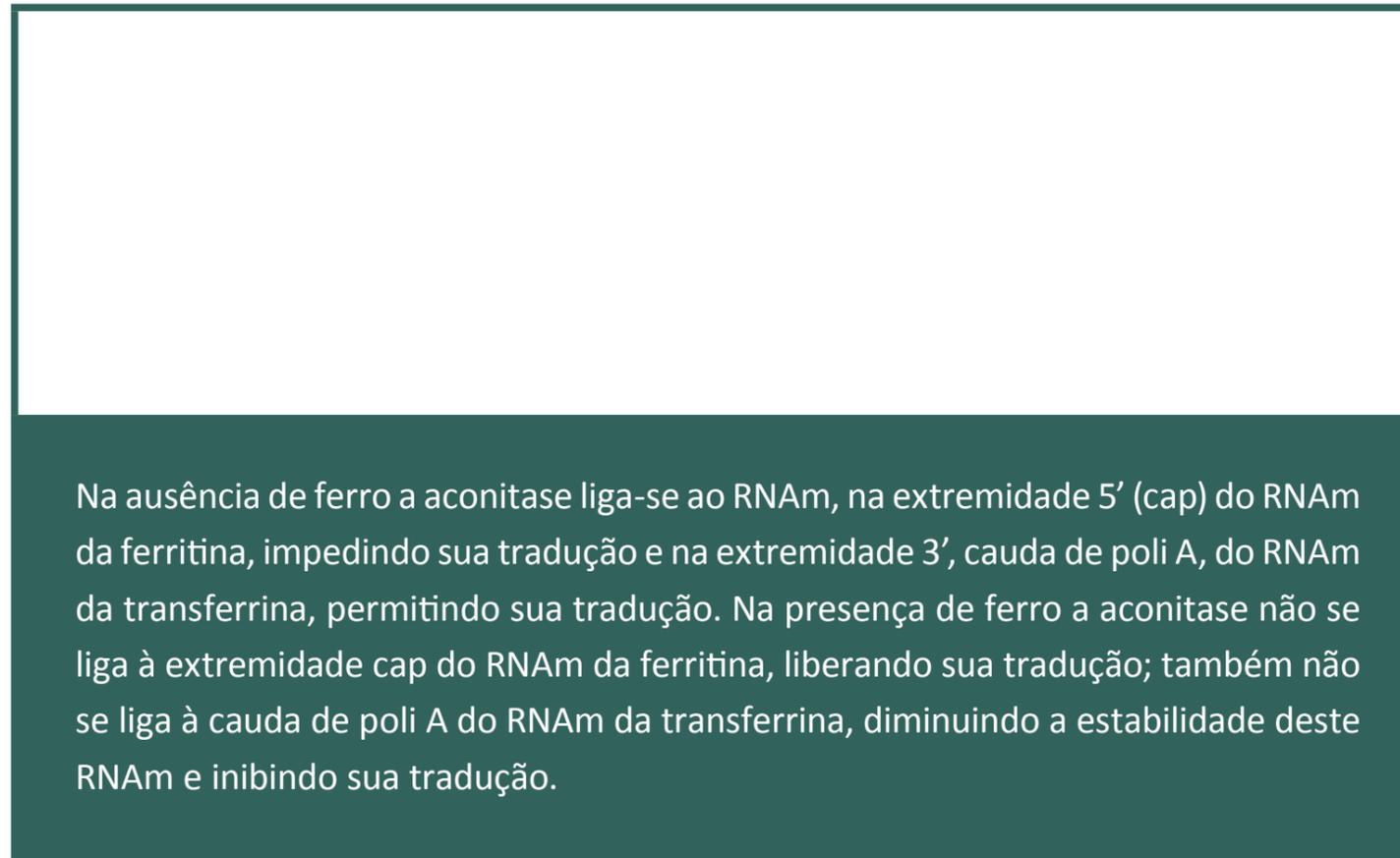
levados à membrana do retículo e quando a PRS se liga a um receptor na membrana desta organela, a síntese proteica continua e o peptídeo sintetizado é introduzido na luz do retículo por meio de um poro na membrana.

A aconitase é uma proteína que regula a atividade de genes diferentes, a ferritina e a transferrina, de maneiras distintas durante o processo de tradução, por meio de bloqueio do início da tradução, no primeiro caso (ferritina) e de alteração da estabilidade do RNAm, o segundo caso (transferrina). A aconitase tem afinidade de ligação ao RNAm na ausência de íons ferro na célula, tanto na extremidade 5' do RNAm, quanto na 3'. Na presença de ferro na célula, este se liga à aconitase, fazendo com que ela perca a afinidade ao RNAm. A ferritina é responsável pelo armazenamento de ferro na célula, desta forma, esta proteína é necessária somente quando existe ferro intracelular para ser armazenado. Então, na presença de ferro a aconitase não está ligada à extremidade 5' do RNAm da ferritina (extremidade cap), permitindo que o ribossomo se ligue nesta região e realize a tradução desta proteína. Na ausência de ferro, a aconitase se liga à extremidade cap e impede que o ribossomo traduza o RNAm, na situação em que a atividade da ferritina não é necessária (Figura 9.1).

A transferrina é uma proteína transmembrana que acentua a entrada de ferro na célula, esta atividade é requerida quando não há ferro no meio intracelular. Assim, na ausência de ferro a aconitase se liga à extremidade 3' do RNAm da transferrina, na região da cauda de poli A, que em geral aumenta a estabilidade do RNAm (Capítulo 6). Na ausência de ferro, a aconitase faz uma “proteção” da cauda do RNAm da transferrina, impedindo sua degradação, permitindo sua tradução e conseqüentemente aumenta a captação de íons ferro no meio extracelular para o meio intracelular. Na presença de ferro dentro da célula, a atividade da transferrina não é necessária. A ligação de íons

ferro à aconitase faz com que esta perca a afinidade ao RNAm e se desligue da cauda de poli A na extremidade 3' do RNAm da transferrina. O RNAm perde, então, a estabilidade que era fornecida pela aconitase, sendo mais rapidamente degradado e diminuindo, portanto, a produção de transferrina (Figura 12).

Figura 12 - Atividade da aconitase na regulação da expressão dos genes da ferritina e transferrina na ausência e presença de ferro



A tradução dos RNAm de eucariotos também é controlada pelo tamanho da cauda de poli A na extremidade 3'. Os RNAm de eucariotos têm uma meia vida, estabilidade, superior aos RNAm de procariotos. Em grande, a estabilidade do RNAm, seu tempo de sobrevivência no citoplasma depende do tamanho da cauda de poli A inserida no

processamento do RNAm (capítulo 6). Uma cauda de, no mínimo, 30 adeninas é requerida para um RNAm estável. Assim, o período de duração e tradução do RNAm depende tanto do acréscimo quanto da remoção seletiva de adeninas da região. Ovócitos em maturação contêm grande quantidade de RNAm no citoplasma que não são traduzidos até, ou quando estes forem fertilizados. Os RNAm armazenados dos ovócitos imaturos apresentam caudas de poli A com cerca de 10 a 30 adeninas, a maturação e/ou fertilização requer a síntese das proteínas dos RNAm armazenados. Assim, a cauda de poli A dos RNAm é aumentada, desencadeando sua tradução.

10 TRANSGÊNICOS

10.1 INTRODUÇÃO

Transgênicos eucariotos são definidos como organismos em que é inserido DNA exógeno, de outra espécie. No entanto, alguns transgênicos são gerados com a incorporação de DNA da mesma espécie, como em casos em que a atividade de um gene defeituoso é substituída pela inserção de um funcional. Existem diferentes métodos para a inserção de um DNA exógeno em uma célula eucariótica:

- **por transformação**, em que processos químicos e/ou físicos tornam as células eucariotas competentes a receber DNA exógeno. Estes processos criam aberturas na parede celular/membrana plasmática que permitem a entrada do DNA na célula;
- **por injeção**, com uma micro-injeção contendo o DNA em solução. O DNA exógeno é inserido, geralmente, em células zigóticas e embrionárias;

- **por infecção viral.** Um vírus atenuado (sem a capacidade de causar doença), que geralmente infecta a espécie, é modificado com segmento de DNA de interesse. No processo normal de inserção do genoma viral na célula eucariota hospedeira, o vírus atenuado e modificado também infecta o genoma hospedeiro com o DNA exógeno;
- **bombardeamento,** é utilizado um disparador de projéteis, geralmente esferas de tungstênio, revestido com DNA exógeno nas células eucarióticas. Dessa maneira, o DNA de interesse consegue transpor a parede celular/membrana plasmática e penetra na célula eucariótica;
- **CRISPR** (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, que significa repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas) CAS 9, esta é uma tecnologia muito recente de transgenia por meio de enzimas bacterianas (CAS 9) de defesa contra o ataque de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias). A enzima CAS 9 cliva sequências palíndromas (a sequência é a mesma, não importando o sentido de leitura, por exemplo AATTAA) curtas e repetidas do DNA viral, destruindo-o. Estas enzimas são usadas, por exemplo, para clivar um gene não funcional e substituí-lo por um alelo funcional, para apagar genes, como também para inserir segmentos de DNA exógeno com diferentes atividades vantajosas ao organismo transgênico receptor.

Para melhor ilustração acompanhe o vídeo:

Uma das vantagens desta nova tecnologia para transgenia em relação às demais é conhecer os sítios específicos de inserção do DNA exógeno. Nos outros processos de transgenia não é possível conhecer, ao certo, a região do genoma hospedeiro em que o DNA exógeno é inserido, podendo, inclusive, a transgenia resultar em mutagênese.

Independentemente da técnica aplicada para a incorporação do DNA exógeno, este DNA deve ser unido a algum vetor modificado, por meio da tecnologia do DNA recombinante.

Vídeo: Técnica do DNA Recombinante.

Os organismos transgênicos, ou geneticamente modificados são elaborados com diferentes objetivos na pesquisa básica e aplicada, existindo muita polêmica quando se considera a produção de alimentos transgênicos. O receio dos críticos à produção destes alimentos é que o DNA exógeno possa causar alergias nos consumidores. No entanto, nenhuma pesquisa, até o momento, efetivamente demonstrou esta relação. O fato é que a escalada na produção de alimentos só é possível por meio da tecnologia dos transgênicos, com a construção de plantas resistentes a diferentes doenças e pragas que muito limitam a produção. Contudo, outras questões surgem, como se esses organismos modificados podem contaminar os tipos selvagem, causando um desequilíbrio ecológico. Os produtores de transgênicos garantem que as plantas são estéreis, o que gera outra controvérsia, pois para serem competitivos os pequenos agricultores devem sempre comprar as sementes transgênicas patenteadas pelas grandes empresas. Outra questão é se a produção de plantas resistentes a herbicidas não expõe os consumidores a altas concentrações de produtos

tóxicos, visto que o produtor não economiza na aplicação dos herbicidas, pois não há receio em matar a planta de interesse juntamente com as consideradas daninhas à produção.

Debate envolvendo os organismos transgênicos à parte, a seguir são descritas aplicações muito importantes desta tecnologia.

10.2 TRANSGENIA EM PLANTAS

Antes da tecnologia CRISPR CAS 9, o vetor mais amplamente utilizado para a produção de plantas transgênicas era a bactéria encontrada no solo *Agrobacterium tumefaciens*. Este procarioto, normalmente, infecta as plantas causando uma enfermidade chamada de doença da galha, que consiste em proliferação acentuada de células (tumor) na base da planta. Na tecnologia transgênica, esta bactéria é atenuada, sua capacidade de causar a doença é desligada. No entanto, a habilidade de infectar a planta permanece intacta. O plasmídeo Ti do *A. tumefaciens* apresenta tanto os genes para a produção do tumor, como os genes capazes de transferir a região produtora do tumor, o T-DNA, no genoma vegetal. O plasmídeo Ti é modificado de modo que resta apenas uma pequena porção do T-DNA, o que elimina os genes do tumor, ligado ao gene de interesse. Assim, quando esta bactéria alterada infecta as células vegetais, há transferência para o genoma da planta hospedeira do DNA exógeno e não dos genes responsáveis pelo desenvolvimento da doença da galha.

Uma das aplicações da transgenia na pesquisa básica é a de genes repórteres. Existem genes nos organismos que, por apresentarem baixa expressão, são de difícil localização espacial (em que lugar do organismo o gene se expressa?) e temporal (existe uma fase específica do desenvolvimento em que o gene se expressa?). Assim, a região promotora que antecede o gene de interesse é ligada à região codificadora de um gene

de fácil visualização da expressão, o gene repórter, de modo que quando são promovidas as condições para a expressão do gene em estudo, este será anunciado, reportado, com a expressão do gene repórter.

Com este objetivo foi produzido um tabaco transgênico com gene da luciferase produzida pelos vagalumes, utilizando como vetor o *A. tumefaciens* modificado. A luciferase é responsável pelo brilho no escuro dos vagalumes. A enzima catalisa a reação entre a luciferina e o ATP, produzindo luz. Quando o tabaco transgênico é borrifado com uma solução de luciferina, ele emite luz. Assim, o gene da luciferase, visualizado com o brilho no escuro, apresenta o mesmo padrão de expressão do gene em estudo.

Outras plantas transgênicas produzidas com a mesma técnica foram a soja resistente ao pesticida glifosato, que gerou algumas das controvérsias discutidas na introdução deste capítulo, e o milho resistente à broca do milho europeu. Neste último exemplo, a resistência do milho transgênico é específica para a larva de inseto que o ataca, não tendo efeito em outros insetos, nem em pessoas ou outros mamíferos. A região do T-DNA do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* é ligada a regiões gênicas que codificam toxinas produzidas pela bactéria *Bacillus thurengensis*, chamadas toxinas Bt. Estas endotoxinas causam furos no tubo digestivo das larvas de insetos. O milho transgênico é capaz, então, de se defender de sua principal praga.

10.3 TRANSGENIA EM ANIMAIS

Alguns animais transgênicos foram gerados com a função de produzir grande quantidade de fármacos, por exemplo a produção do ativador do plasminogênio, usado para dissolver coágulos sanguíneos, no leite de ovelhas. Para atingir este objetivo, um plasmídeo foi construído com o promotor do gene da β -lacto-globulina, expresso apenas no tecido

mamário, ligado à região codificadora do ativador do plasminogênio. Este DNA foi injetado em pró-núcleo de um zigoto de ovelha que foi então implantado em uma mãe adotiva. Esta prole transgênica expressa o gene de interesse apenas no tecido mamário, todas as vezes que a expressão do gene da β -lacto-globulina é ativada, também é estimulada a produção do ativador do plasminogênio. Desta forma, é possível purificar grandes quantidades de um produto gênico de interesse do leite.

Um outro emprego da transgenia, em animais, é na terapia gênica. Existem camundongos que têm um gene mutante recessivo *little* (lit), que resulta em animais anões, curados por transgenia. Apesar destes mutantes apresentarem o gene do hormônio do crescimento, ele não é expresso. Em zigotos foram injetados homozigotos recessivos lit/lit DNA construído com a região codificadora do hormônio do crescimento ligada à região promotora de um gene de metalotioneína de camundongo. A função dos genes da metalotioneína é detoxificação celular contra metais pesados. Toda vez que os camundongos transgênicos são expostos a metais pesados ao longo do desenvolvimento, além dos genes da metalotioneína regulares do genoma dos camundongos serem expressos, também é estimulada a produção do DNA exógeno, ligado a segmentos gênicos ativos do hormônio do crescimento. Os camundongos transgênicos lit/lit atingiram tamanho semelhante aos camundongos selvagens lit+, com o DNA exógeno funcionando como um alelo dominante. Essa terapia gênica não fornece uma cura real da mutação, pois o local de inserção do DNA exógeno não é no mesmo *locus* do alelo mutante, mas esta tecnologia é promissora em mascarar o defeito.

A mesma técnica da região codificadora do hormônio do crescimento ligada à região promotora de genes da metalotioneína foram empregadas em salmão para fins comerciais. Os peixes transgênicos apresentaram peso cerca de 11 vezes superior aos peixes não transgênicos.

Nas terapias gênicas, descritas nos exemplos dos camundongos e salmões, o DNA exógeno foi inserido em células zigóticas. Um outro tipo de terapia de células da linhagem germinativa que pode ser empregada em humanos é transferir o DNA exógeno no estágio de blastocisto. No entanto, pelo que foi divulgado, esta técnica de terapia ainda não foi aplicada em humanos. A terapia de células germinativas pode alterar tanto algumas células somáticas em que a transferência ocorre, como também as células germinativas, podendo fazer com que algumas células gaméticas produzidas pelo indivíduo transgênico apresentem o efeito do DNA exógeno.

Exemplos de terapia gênica em humanos fornecidos são de terapia gênica somática, que ameniza o efeito de uma doença que afeta células somáticas específicas. Nesta técnica, uma amostra de células defeituosas do indivíduo é retirada, são introduzidas cópias do gene funcional clonado e estas células, agora transgênicas, são reintroduzidas no indivíduo afetado. Um exemplo de vetor de transferência do gene funcional na célula somática defeituosa é a utilização de um retrovírus, atenuado, com o gene de interesse em seu genoma. A infecção normal do retrovírus na célula afetada leva à transferência do gene de interesse para o genoma da célula hospedeira. A limitação desta técnica, na terapia gênica, é que o retrovírus infecta apenas células em constante divisão celular, como as células sanguíneas, além de poder causar uma outra mutação, dependendo do local do genoma em que o DNA exógeno é inserido. Esta terapia foi usada, com sucesso, no tratamento da doença conhecida como doença da bolha, em que os indivíduos são mutantes para a enzima sanguínea adenosina desaminase (ADA), causando uma imunodeficiência severa nesses pacientes.

Um vetor mais adequado para a terapia gênica somática em humanos é o adenovírus. Este vírus ataca as células do epitélio respiratório e não insere o material genético no genoma do hospedeiro, mas permanece como um cromossomo extra em todas

as células infectadas, não causando mutação no genoma hospedeiro como os retrovírus. A outra vantagem deste vetor, em relação ao retrovírus, é que ele infecta células diferenciadas, podendo, em tese, ser usado como vetor para a terapia da maioria dos tecidos humanos. Adenovírus atenuados e portadores do alelo selvagem da fibrose cística são sendo usados para abrandar os efeitos deletérios no sistema respiratórios de pacientes com esta doença. O tratamento da fibrose cística, por este método, ainda tem a vantagem de não ser invasivo, pois os indivíduos afetados utilizam um *spray* nasal para inserir o adenovírus modificado em seu sistema respiratório.

Sugestão de animação:

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Genética Molecular está em constante evolução, novas descobertas e tecnologias que permitem o acesso e manipulação do material genético surgem a cada instante. Por isto, além da necessidade de se manter atualizado, é de extrema relevância conhecer a metodologia por trás desta ciência e, assim, avaliar os reais impactos das técnicas na sociedade, os limites éticos da alteração do genoma dos organismos e distinguir a ciência das falácias e mitos. Quando um cientista faz uma planta brilhar no escuro, ou uma orelha humana se desenvolver no dorso de um camundongo, o objetivo das pesquisas não é construir aberrações, brincar de Deus, mas sim, nestes exemplos, entender os fatores e condições que podem ou não interferir na expressão de genes. O

conhecimento destas metodologias e objetivos diferencia o biólogo licenciado do público leigo, manipulável por informações falsas de ideologias que nada têm a contribuir com o desenvolvimento da ciência. Por outro lado, também torna possível questionar as verdadeiras intenções de determinadas pesquisas que ferem a ética científica, visam apenas lucro, e colocam o delicado equilíbrio do meio ambiente em risco.

Este e-book pretendeu contribuir para a apresentação de alguns tópicos importantes da Genética Molecular, fornecendo subsídios para o entendimento e análise crítica das controvérsias que envolvem esta ciência.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K; Walter, P.; WILSON, J.; Hunt, T. *Biologia molecular da célula*, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BROWN, T. A. *Genética - um enfoque molecular*, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. *A célula* 2001. São Paulo: Manole, 2001.

CHARGAFF, E.; VISCHER, E.; DONIGER, R.; GREEN, C.; MISANI, F. (1949). The composition of the desoxypentose nucleic acids of thymus and spleen. *Journal of Biological Chemistry*, 177: 405-416.

CHARGAFF, E.; CRAMPTON, C. F.; LIPSHITZ, R. (1953). Separation of calf thymus deoxyribonucleic acid into fractions of different composition. *Nature*, 172 (4372): 289-292.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. *Introdução à genética*, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

KREBS, J. E.; GOLDSTEIN, E. S.; KILPATRICK, S. T. *Lewin's GENES XII*, 12. ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2017.

MATIOLI, S. R; FERNANDES, F. M. C. *Biologia molecular e evolução*, 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2012.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. (1953). Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature*, 171: 737-738

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. *Biologia molecular do gene*, 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

WILKINS, M. H. F.; RANDALL, J. T. (1953). Crystallinity in sperm heads: molecular structure of nucleoprotein in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10: 192-193.

WONG, S. K.; WONG, L. F.; LIM, Y. Y.; CHAN, E. W. C. (2010). Effects of drying treatments on the antioxidant properties of leaves and teas of *Alpinia* species. *Journal of Tropical Medicinal Plants*, 11: ????????

ZAMENHOF, S.; BRAWERMAN, G.; CHARGAFF, E. (1952). On the desoxypentose nucleic acids from several microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 9: 402-405.