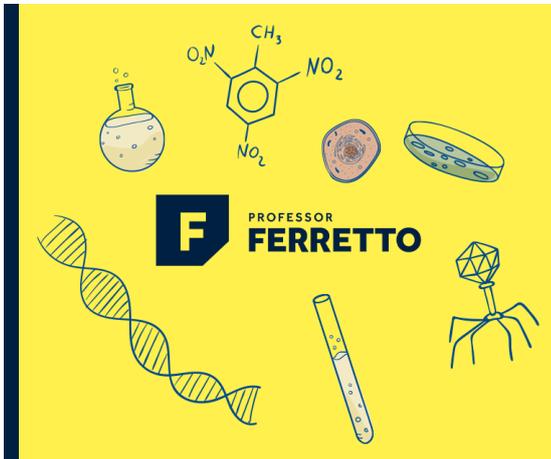


Biologia

PROFESSOR FLÁVIO LANDIM



ASSUNTOS DA AULA.

Clique no assunto desejado e seja direcionado para o tema.

- [DNA e genes](#)
- [Nucleotídeos](#)
- [Componentes dos nucleotídeos](#)
- [Nucleosídeos e nucleotídeos](#)
- [Funções dos nucleotídeos](#)
- [Polinucleotídeos](#)
- [DNA](#)
- [Replicação ou autoduplicação do DNA](#)
- [Experimento de Meselson e Stahl](#)
- [Leituras complementares](#)

ÁCIDOS NUCLEICOS PARTE I: DNA E REPLICAÇÃO

Os ácidos nucléicos são macromoléculas de suma importância biológica. Os organismos vivos contêm ácidos nucléicos na forma de **ácido desoxirribonucleico (ADN ou DNA)** e **ácido ribonucleico (ARN ou RNA)**. Os vírus apresentam apenas um deles, ou DNA (sendo chamados de desoxivírus) ou RNA (sendo chamados de ribovírus).

Em todos os organismos celulares, é o DNA que corresponde ao material genético. Em células eucarióticas (com núcleo organizado por carioteca), o DNA se encontra associado a proteínas denominadas **histonas**, formando complexos denominados **cromonemas** ou **cromossomos**, que se encontram organizados aos pares (pares de cromossomos homólogos).

A grande importância dos ácidos nucléicos está na sua capacidade de armazenar a informação genética, sendo estas moléculas ditas informacionais. Esta informação está armazenada na sequência de bases nitrogenadas nos nucleotídeos que os compõem, e se expressa na forma de proteínas que determinam todas as características e funções do organismo. Esse papel faz dos ácidos nucléicos moléculas essenciais a qualquer forma de vida e também a vírus.

Numa comparação grosseira, os ácidos nucléicos equivalem a um livro de receitas com as instruções para gerar cada aspecto da estrutura e função de um organismo vivo. Nessa comparação, as letras utilizadas para escrever esse livro são os nucleotídeos. Cada receita, para produzir certo aspecto em particular (certa "característica"), é denominada gene. Assim, genes são encontrados em cromossomos, e como estes se encontram aos pares nas células eucarióticas, genes também se encontram aos pares.

DNA E GENES

O que é o gene? **Gene** ou **cístron** é um segmento de molécula de DNA (molecularmente falando, o gene pode ser chamado de cístron; ou seja, o gene é um segmento de DNA chamado cístron) que contém a informação necessária à produção de um polipeptídio, ou seja, uma sequência de aminoácidos que, ou dá origem a uma proteína, ou a um pedaço de proteína. Assim, cada peptídio que é produzido no organismo só é produzido porque existe um pedaço na molécula de DNA que, devido ao código genético, é base para formação da mesma.

Proteínas com estrutura quaternária, como a hemoglobina, apresentam vários peptídios em sua estrutura, e por isso precisam de vários genes para controlar sua síntese. Na hemoglobina, há um gene para produzir a cadeia α e outro para produzir a cadeia β . Por exemplo, a cadeia α é formada a partir de um gene no par de cromossomos 16, e a cadeia β no par de cromossomos 11.

Até certo tempo, o mecanismo de funcionamento do gene era conhecido como teoria “**um gene - uma enzima**”. Entretanto, como nem todas as proteínas são enzimas, essa foi modificada para “**um gene - uma proteína**”. Por fim, devido à existência de proteínas com estrutura quaternária e mais de uma cadeia polipeptídica, essa foi novamente modificada para “**um gene - um polipeptídeo**”.

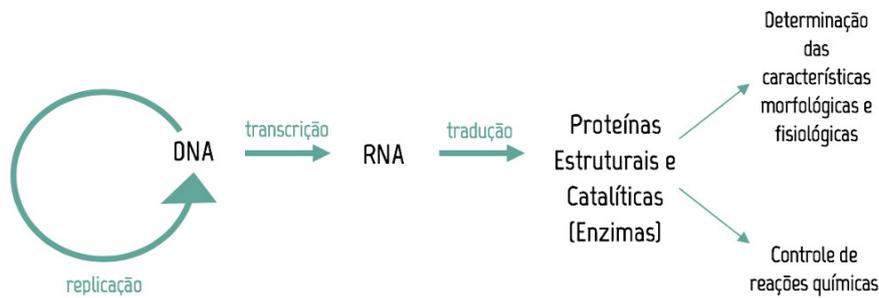
Como o gene pode controlar determinada característica genética? Para responder a esta pergunta, é bom falar em como o DNA controla todo e qualquer processo vital. A maioria das moléculas que compõem o organismo vivo são moléculas orgânicas, que reagem entre si em cada processo vital. Só que as moléculas orgânicas são, por natureza, altamente estáveis. Isto significa que, por exemplo, ao colocarmos dois aminoácidos para reagir, como eles são estáveis, eles não iriam reagir facilmente; sendo que esta reação poderia demorar milhões de anos para acontecer. Obviamente, um organismo vivo não poderia esperar milhões de anos para determinada reação acontecer. Estas reações só acontecem em tempo biologicamente viável porque existem compostos que aceleram milhões de vezes a velocidade da reação: as enzimas.

Para cada reação que acontece no organismo, deve existir uma enzima específica responsável. Se controlarmos, pois, a produção das enzimas, controlaremos conseqüentemente as respectivas reações. Por exemplo, se quisermos promover determinada reação, basta produzir a enzima correspondente. Quem controla a produção de enzimas?

Bem, enzimas são proteínas e, como tal, o DNA controla sua síntese. Deve-se observar então, que o DNA controla o organismo controlando a produção de enzimas que controlarão cada reação que acontece.

Só que o DNA está localizado no núcleo, e os ribossomos, produtores de proteínas, estão no citoplasma. Para que o DNA atue, ele copia a informação de como produzir uma proteína determinada numa molécula denominada RNA mensageiro, que sai do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, o RNAm vai até os ribossomos, que o interpretam (e para isso, há um código denominado código genético) e produzem a proteína requerida.

O chamado **Dogma Central da Biologia Molecular** apresenta uma síntese dos processos celulares que envolvem os ácidos nucleicos e a expressão gênica. Assim, temos:



Isto explica, resumidamente, a capacidade de autoduplicação do DNA e a transmissão da informação gênica para a maquinaria de síntese proteica através da produção de RNA (transcrição) e posterior montagem da proteína (tradução). Na natureza, a informação gênica caminha do DNA para o RNA.

E afinal, como os genes controlam características hereditárias, como a cor do olho ou a cor da pele? Simplesmente, uma característica corporal aparece devido a alguma proteína que determina alguma função que gera a característica. Se o olho de algum indivíduo é preto, por exemplo, é porque este indivíduo possui, no DNA, um gene que produz alguma proteína (uma enzima, por exemplo) que, através de alguma reação, produz pigmento preto para o olho.

Genes recessivos são genes defeituosos, que produzem um RNAm alterado, e daí então uma proteína alterada que equivale a uma enzima não funcional. Como a enzima não funciona, não há reação química e a característica produzida será alterada. Por exemplo, o gene para olho azul produz uma enzima incapaz de gerar pigmento preto. Na ausência de pigmento preto, a íris se tornará transparente, dando a impressão de uma tonalidade azul. Assim, não faz sentido afirmar que, bioquimicamente, genes dominantes inibem genes recessivos.

Se o indivíduo duplo dominante possui dois genes funcionando e o heterozigoto apenas um, por que o duplo dominante não produz mais enzimas e tem um fenótipo mais expressivo? Respondendo: O duplo dominante realmente produz mais enzimas, mas se você lembra que as enzimas atuam em concentrações muito pequenas, vai entender que mesmo a quantidade de enzimas produzida pelo heterozigoto já é suficiente para produzir a reação e característica desejada. Em outras palavras, para a reação enzimática, tanto uma quantidade X como uma quantidade 2X de enzima produzem o mesmo resultado, porque, como a enzima atua em pequenas concentrações, provavelmente uma quantidade bem menor de enzima, como X/2 ou menos, já seria suficiente para promover a reação em velocidade máxima.

Tome nota:

- Na **ausência de dominância**, a diferença na quantidade de moléculas de enzimas produzidas leva a diferentes expressões fenotípicas, de modo que o indivíduo homocigoto dominante, produzindo maior quantidade de moléculas de enzimas, irá gerar maior quantidade de produto, apresentando fenótipo mais intenso que o heterocigoto, que, produzindo menor quantidade de moléculas de enzimas, irá gerar menor quantidade de produto, apresentando fenótipo menos intenso. Assim, casos de heterocigose em ausência de dominância se apresentam como uma gradação ou uma mistura de dois caracteres. Por exemplo, no caso da flor da planta *Mirabilis sp* (maravilha): o gene V condiciona cor vermelha por produzir enzimas que levam à produção de pigmento dessa cor, e o gene B condiciona cor branca por não produzir enzimas funcionais; o indivíduo VV produz o dobro da quantidade de enzima do indivíduo VB, produzindo conseqüentemente o dobro da quantidade de pigmento vermelho, de modo que o homocigoto VV tem flores vermelhas e o heterocigoto VB têm flores rosas ("gradação" ou "mistura" entre o vermelho do homocigoto VV e o branco do homocigoto BB).

- Na **codominância**, não há genes recessivos, ou seja, ambos os genes envolvidos na herança são funcionais. Assim, o heterocigoto apresenta os dois caracteres simultaneamente, como, por exemplo, nos grupos sanguíneos do sistema ABO na espécie humana: o heterocigoto I^AI^B apresenta um fenótipo AB, ou seja, A e B simultaneamente.

NUCLEOTÍDEOS

Os monômeros formadores dos ácidos nucleicos são estruturas denominadas **nucleotídeos**, compostos por:

- Uma molécula de açúcar do grupo das **pentoses** (monossacarídeo com cinco átomos de carbono): desoxirribose no DNA e ribose no RNA;
- Uma **base nitrogenada** purina (dotada de dois anéis carbônicos conjugados) ou pirimidina (dotada de um único anel carbônico); são purinas adenina e guanina e pirimidinas timina, citosina e uracila;
- **Ácido fosfórico**, que inclusive confere o caráter ácido aos ácidos nucleicos.

Os ácidos nucleicos são formados por **polinucleotídeos**, polímeros de nucleotídeos. O "esqueleto" de um ácido nucleico é composto por fosfatos e pentoses que se alternam. As bases nitrogenadas estão ligadas aos açúcares desse "esqueleto", ficando lateralmente à cadeia de polinucleotídeos.

O grupo livre de ácido capacita a molécula de ácido nucleico a formar ligações iônicas com proteínas básicas (por exemplo, o DNA das células eucarióticas está associado a proteínas básicas denominadas histonas, formando um complexo núcleo-proteico chamado de cromatina ou cromossomo; em células procarióticas o DNA não está em associação com proteínas, sendo dito DNA desnudo).

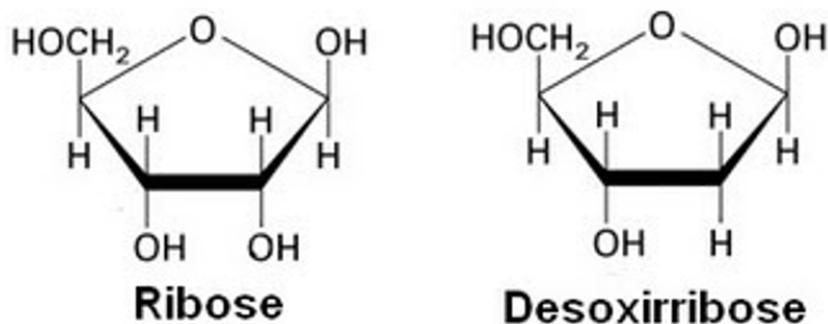
COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

Nucleotídeos são compostos por três unidades: uma **pentose** (açúcar simples de 5 carbonos), uma **base nitrogenada** e um ou mais **grupos fosfato**.

1. PENTOSSES

As pentoses são de dois tipos: **desoxirribose**, no DNA, e **ribose**, no RNA. A única diferença entre estes dois açúcares é que a desoxirribose possui um átomo de oxigênio a menos: a desoxirribose tem fórmula molecular $C_5H_{10}O_4$ e a ribose tem fórmula molecular $C_5H_{10}O_5$. Uma reação citoquímica específica para a desoxirribose, denominada reação de Feulgen, pode ser empregada para a visualização do DNA ao microscópio. As estruturas com DNA assumem uma forte coloração vermelha, proporcional ao próprio conteúdo de DNA. Como essa reação é exclusiva para o DNA, serve para diferenciar as estruturas que contêm DNA das que não contêm DNA. As primeiras são ditas Feulgen positivas e as segundas, Feulgen negativas.

Um dos motivos pelos quais o DNA é mais estável que o RNA está na desoxirribose, que tendo um átomo de oxigênio a menos que a ribose, é menos reativo que a mesma.



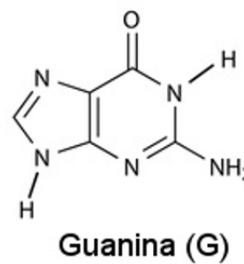
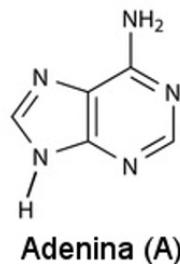
Os cinco átomos de carbono da pentose são numerados, em sentido horário, a partir do carbono seguinte ao oxigênio do anel (carbono 1'). Observe a ocorrência de um átomo de oxigênio a menos na desoxirribose no carbono 2', que apresenta um hidrogênio, (-H) em relação à ribose, que apresenta uma hidroxila (-OH).

Tome nota:

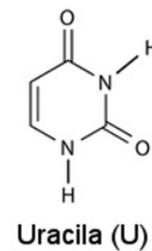
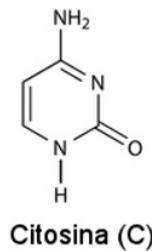
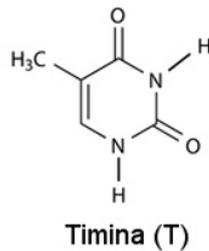
2. BASES NITROGENADAS

As bases nitrogenadas encontradas nos ácidos nucleicos são de dois tipos: **pirimidinas** e **purinas**. As pirimidinas possuem um único anel heterocíclico, enquanto que as purinas tem dois anéis heterocíclicos conjugados. No DNA, as purinas são adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas são timina (T) e citosina (C); o RNA contém uracila (U) ao invés de timina.

Assim, as diferenças entre o DNA e o RNA são as presenças de desoxirribose e timina no primeiro, no lugar de ribose, e uracila no segundo. A diferença das bases pirimidinas, timina e uracila no DNA e RNA, permitiu aos biólogos celulares o uso de timina radioativa (timina- H^3 , também chamada timina-trítio) como marcador de DNA e de uracila radioativa (uracila- H^3 ou uracila-trítio) como marcador de RNA.



Bases purinas.



Bases pirimidinas.

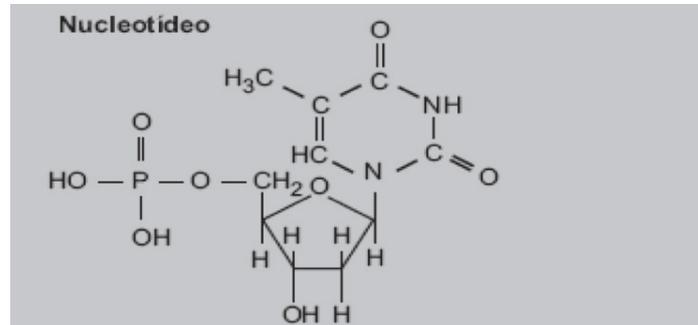
3. FOSFATO

O fosfato é derivado do ácido fosfórico (H_3PO_4) e se liga à pentose no nucleotídeo. Daí vem o caráter ácido de um "ácido" nucleico.

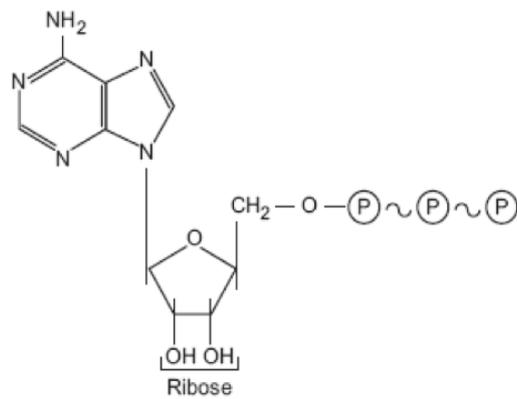
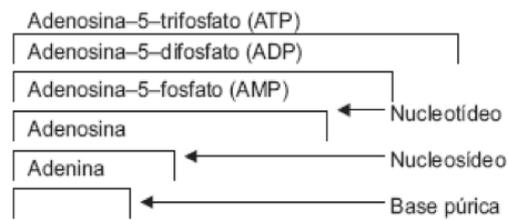
NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS

A combinação de uma base e uma pentose, sem o fosfato, compõe o **nucleosídeo**. Por exemplo, a adenina é uma base purina, a adenosina (adenina + ribose) é o nucleosídeo correspondente. Adicionando fosfato ao nucleosídeo, temos o nucleotídeo (base, pentose e fosfato).

A pentose é o elo de ligação entre a base nitrogenada e o grupo fosfato. No carbono 1' da pentose, liga-se a base, e o no carbono 5' da pentose, liga-se o grupo fosfato.



Como exemplos de nucleotídeos, temos a adenosina monofosfato (AMP), a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina trifosfato (ATP), contendo respectivamente um, dois e três grupos fosfato.



Estrutura do ATP.

Tome nota:

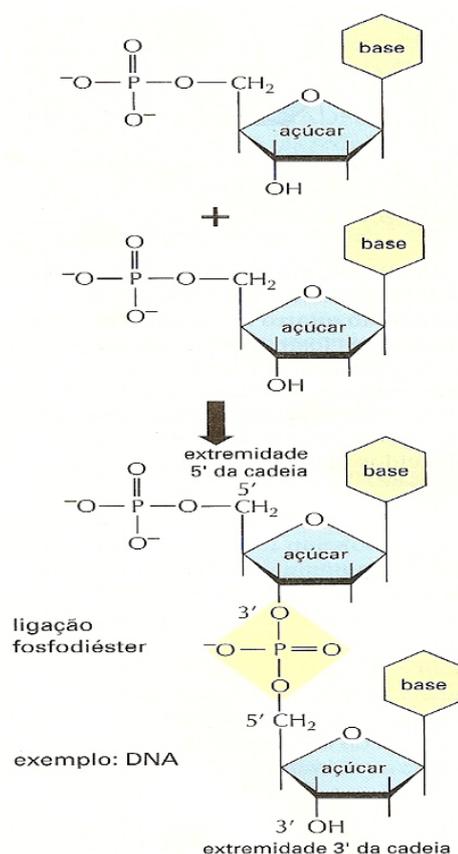
FUNÇÕES DOS NUCLEOTÍDEOS

Além de atuarem como as unidades constituintes dos ácidos nucléicos, alguns nucleotídeos são também importantes por armazenarem e transferirem energia química. A figura anterior mostra que as duas ligações fosfato terminais do **ATP** contêm grande quantidade de energia (representadas pelo sinal ~, que representa uma ligação química de alta energia). Quando estas ligações são quebradas, a energia liberada, cerca de 7,3 kcal/mol, pode ser empregada na realização de diversas reações celulares. A ligação ~P, de alta energia, torna a célula capaz de acumular grande quantidade de energia num espaço reduzido, mantendo-a pronta para uso, quando necessário, por hidrólise enzimática do ATP.

Alguns nucleotídeos apresentam importante função de sinalização celular, ativando enzimas do meio intracelular como resposta a estímulos do meio extracelular. O **AMPc** (AMP cíclico) é o principal dentre os **2^{os} mensageiros da ação hormonal**. Muitos hormônios agem em receptores na membrana plasmática. Ao se ligarem a esses receptores, os referidos hormônios ativam a enzima adenilato-ciclase, que converte o ATP intracelular em AMPc. O AMPc ativa então certas enzimas intracelulares, proporcionando o efeito hormonal.

POLINUCLEOTÍDEOS

Nucleotídeos se ligam entre si através da **ligação fosfodiéster 3'5'**. Esta ligação ocorre entre uma **hidroxila no carbono 3' da pentose de um nucleotídeo** e o **fosfato ligado ao carbono 5' da pentose do outro nucleotídeo**. Vários nucleotídeos se ligam em cadeia simples, não ramificada para formar um polinucleotídeo. Devido à especificidade das enzimas responsáveis pelo processo, elas só podem acrescentar nucleotídeos na extremidade 3' do polinucleotídeo, ou seja, do lado da pentose, nunca do lado do fosfato (que equivale à extremidade 5'). Deste modo, a cadeia de polinucleotídeos sempre cresce no sentido 5' - 3'.



Ligação fosfodiéster 3'5'.

Os polinucleotídeos de maior importância são o DNA e o RNA.

DNA

O **DNA** ou **ADN** está presente nos organismos vivos na forma de moléculas lineares de peso molecular extremamente elevado. A *Escherichia coli*, bactéria encontrada normalmente no trato digestivo humano, por exemplo, possui uma única molécula de DNA, que pesa em torno de $2,7 \times 10^{14}$ Daltons (D, unidade de massa molecular) e tem um comprimento total de 1,4 mm. Em organismos superiores, a quantidade de DNA pode ser milhares de vezes maior. Por exemplo, se todo o DNA de uma única célula diploide humana fosse esticado,

o comprimento total seria de aproximadamente 1,7 m!!! O DNA é encontrado não ligado a proteínas histonas em células procarióticas (sendo chamado de desnudo) ou ligado a proteínas básicas histonas formando complexos de **cromatina** ou **cromossomos** em células eucarióticas. As histonas formam complexos com o DNA denominados nucleossomas, e a combinação desses **nucleossomas** origina o filamento de cromatina / cromossomo. A estrutura do cromossomo será estudada posteriormente.

Segundo a Teoria Uninêmica, cada cromossomo equivale a uma única molécula de DNA.

Toda a informação genética de um organismo vivo está armazenada em uma sequência linear das quatro bases nitrogenadas. Portanto, um alfabeto de quatro letras (A, C, T e G) deve codificar a sequência primária de todas as proteínas. Uma das mais extraordinárias descobertas da Biologia Molecular foi a elucidação deste código.

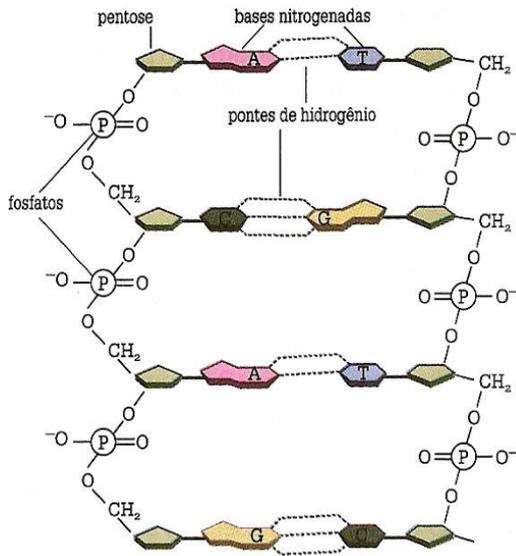
Na descoberta da estrutura do DNA, duas descobertas foram essenciais:

I. **Chargaff** descobriu que o total de purinas é igual ao de pirimidinas, isto é, $A + G = T + C$. Mais do que isso, a quantidade de adeninas é igual à de timinas e a quantidade de guaninas é igual à de citosinas, isto é, $A = T$ e $G = C$. Assim, se a percentagem de uma das bases é conhecida, todas as outras podem ser determinadas. Por exemplo, se o percentual de adeninas é de 20%, temos:

$$A = 20\% \rightarrow A = T \rightarrow T = 20\% \rightarrow A + T = 20\% + 20\% = 40\% \rightarrow G + C = 100\% - (A + T) = 100\% - 40\% = 60\% \rightarrow G = C = 30\%$$

II. Em 1953, baseados nos dados de difração de raios X, **James D. Watson** e **F. H. C. Crick**, propuseram um modelo de estrutura do DNA que explicava a regularidade de sua composição de bases e suas propriedades biológicas, particularmente sua duplicação na célula. Segundo eles, o DNA é composto de duas cadeias helicoidais de polinucleotídeos formando uma dupla hélice em torno de um eixo central imaginário. As bases estão empilhadas dentro da hélice num plano perpendicular a seu eixo. Esta descoberta valeu o prêmio Nobel do ano de 1962.

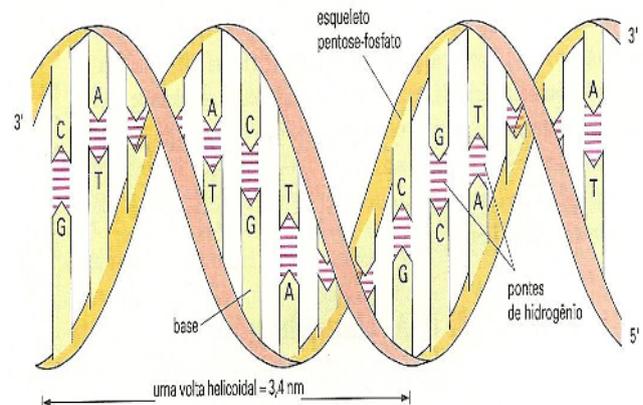
As duas fitas são unidas por pontes de hidrogênio estabelecidas entre os pares de bases. Desde que exista uma distância mínima entre as duas moléculas de açúcar das tiras opostas, somente certos pares de bases podem se encaixar na estrutura. Os únicos pares possíveis são A-T e G-C. É interessante notar que existem **duas pontes de hidrogênio** formadas entre **A e T** e três entre **C e G**, o que explica porque A e C e G e T não se ligam.



Modelo de Escada: o DNA pode ser visto como uma escada, com os corrimãos sendo o esqueleto de pentoses e fosfatos alternados, ligados por ligações fosfodiéster, e os degraus sendo as bases nitrogenadas unidas pelas pontes de hidrogênio.

No DNA, cada base púrica de uma cadeia se liga, por pontes de hidrogênio, a uma base pirimídica da outra cadeia. As pontes de hidrogênio são ligações fracas entre oxigênio e hidrogênio ou nitrogênio e hidrogênio (são ligações físicas, por atração eletrostática, e não ligações químicas). Entre adenina e timina, há sempre duas pontes de hidrogênio. Entre citosina e guanina, existem três pontes de hidrogênio.

A dupla-hélice tem **giro para direita** (sentido horário) e dá uma **volta completa a cada 10 pares**. Ela possui duas regiões chamadas sulcos, produzidos pelo giro das cadeias, sendo um **sulco maior** e um **sulco menor**.

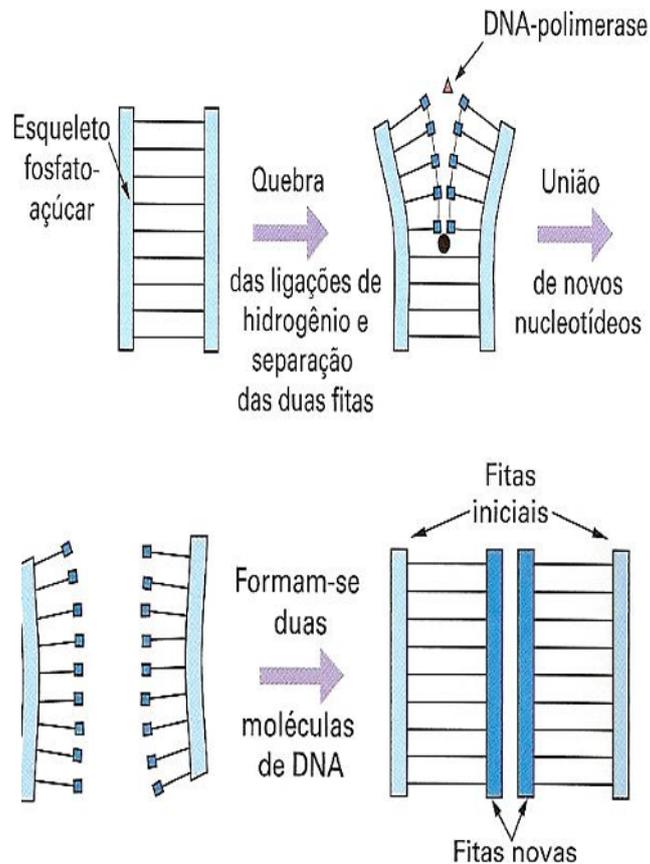


Tome nota:

REPLICAÇÃO OU AUTODUPLICAÇÃO DO DNA

O DNA tem a capacidade de autoduplicação. A principal enzima atuante nesse processo é a **enzima DNA polimerase**. Durante a duplicação do DNA, as duas cadeias se dissociam devido à quebra das pontes de hidrogênio entre as bases de cadeias complementares, por ação da enzima **DNA helicase**. Simultaneamente, a enzima **DNA polimerase** vai ligando às bases sem pares novos nucleotídeos, complementares aos da cadeia original, e vai ligando estes novos nucleotídeos entre si. Este processo origina duas moléculas-filhas de DNA, idênticas à molécula-mãe. Assim, ocorre uma duplicação **semiconservativa**, pois, como se percebe, no decorrer do processo de duplicação (ou replicação) do DNA, as moléculas-filhas conservam uma fita da molécula inicial (as duas fitas da molécula-mãe se separam e novas fitas entram em ação, completando a estrutura a partir de cada tira original). Isso é importantíssimo por dois motivos:

- Originando duas moléculas a partir de uma, garante-se a **reprodução** do organismo;
- Originando duas moléculas idênticas entre si, garante-se que os descendentes mantenham as características de seus genitores, ou seja, garante-se a **hereditariedade**.



Replicação semiconservativa.

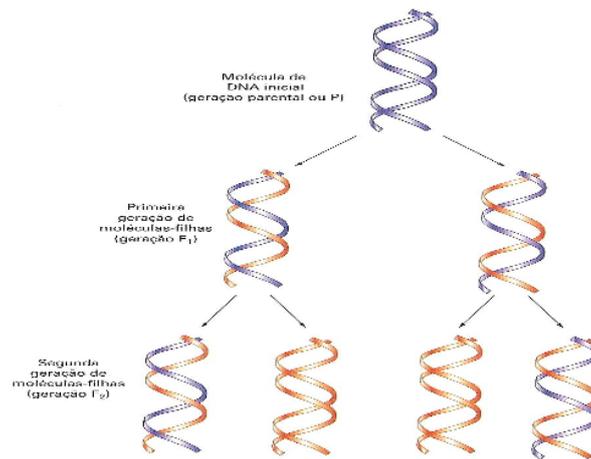
A replicação do DNA acontece numa fase do ciclo celular denominada interfase, mais precisamente no que se chama período S (do inglês *synthesis*, 'síntese'), e sempre precede a divisão celular.

EXPERIMENTO DE MESELSON E STAHL

Em 1957, os pesquisadores Matthew **Meselson** e Franklin **Stahl** forneceram evidências experimentais que corroboram esse modelo. Um resumo dos experimentos que eles fizeram está explicado a seguir de forma simplificada.

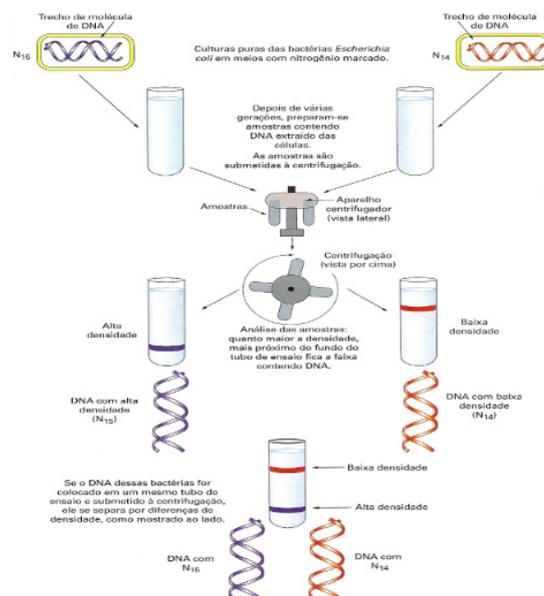
Esses pesquisadores trabalharam cultivando bactérias *Escherichia coli* em meio contendo o isótopo “pegado” do nitrogênio (N_{15}), e outras em meio contendo o isótopo “leve” do nitrogênio (N_{14}).

O nitrogênio é incorporado às bases nitrogenadas empregadas na síntese de novas moléculas de DNA.



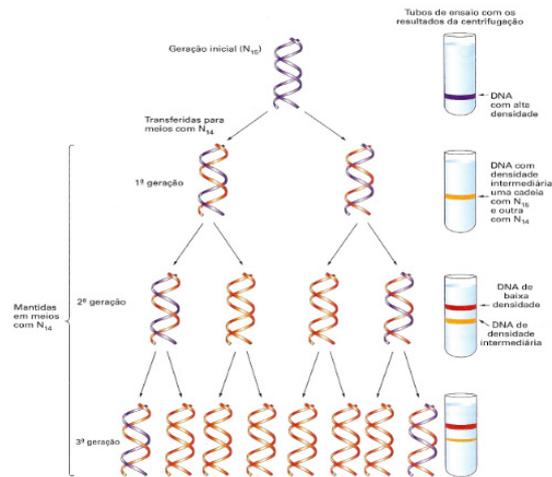
Esquema do mecanismo de duplicação do DNA como proposto por Watson e Crick: a duplicação semiconservativa.

As bactérias provenientes de cada cultura foram tratadas com determinadas substâncias químicas para haver liberação do DNA celular e depois o material foi submetido à centrifugação. Por diferenças de densidade, obtiveram-se os resultados a seguir.



Esquema mostrando a obtenção de DNA com densidades diferentes em laboratório, com base no trabalho de Meselson e Stahl.

Sabendo que é possível separar o DNA por densidade em função dos isótopos do nitrogênio, Meselson e Stahl transferiram as bactérias do meio de cultura com N_{15} para um meio de cultura com N_{14} . Depois de uma, duas e três gerações, prepararam amostras do DNA para centrifugação, obtendo os resultados a seguir.



Esquema de experimento com DNA de bactéria *Escherichia coli*, mostrando o caráter semiconservativo da sua duplicação.

Na primeira geração, as moléculas de DNA apresentaram densidade intermediária. Isso é um indício de que cada uma dessas moléculas é formada por uma cadeia de nucleotídeos da geração inicial (com N_{15}) e por uma cadeia recém-sintetizada, que possui N_{14} .

Na segunda geração, formaram-se moléculas de DNA com densidade intermediária e com densidade baixa, em quantidades iguais.

Na terceira geração, formaram-se moléculas de DNA com densidade intermediária em pequenas quantidades e com densidades baixa em quantidade menor.

Esses resultados corroboram o esquema de duplicação semiconservativa do DNA, como Watson e Crick haviam proposto.

Extraído de Sônia Lopes, Bio volume 2.

Tome nota:

LEITURA COMPLEMENTAR

Sistemas enzimáticos na replicação do DNA

Na verdade, a DNA polimerase não é a única enzima a atuar no processo de duplicação do DNA, apesar de ser, com certeza, a mais importante. A DNA polimerase polimeriza desoxirribonucleotídeos que se pareiam a cada uma das fitas que formam o DNA: os nucleotídeos se pareiam espontaneamente pela formação de pontes de hidrogênio, obedecendo à relação de Chargaff, de modo que A pareia com T, T pareia com A, G pareia com C e C pareia com G.

Durante a replicação, há a formação de uma região que se desloca ao longo da dupla-hélice de DNA parental. Devido à sua estrutura em forma de Y, essa região ativa é denominada **forquilha de replicação**. Na forquilha de replicação, o DNA de ambas as fitas é sintetizado por um complexo multienzimático que contém a DNA polimerase.

A síntese de DNA é iniciada por pequenos fragmentos de RNA

Uma característica da DNA polimerase é que ela é incapaz de iniciar a polimerização, uma vez que apenas pode adicionar novos nucleotídeos a uma fita que já está iniciada (lembre-se que estes novos nucleotídeos apenas podem ser adicionados na extremidade 3' da cadeia que cresce). Um iniciador especial faz-se necessário então, para oferecer à DNA polimerase uma extremidade 3' a partir da qual ela pode continuar a polimerização dos nucleotídeos. Esse iniciador é um pequeno fragmento de RNA (de cerca de 10 nucleotídeos) denominado **RNA primer**, que é sintetizado por uma enzima denominada **DNA primase**. Na fita líder, esse *primer* é necessário uma única vez, tendo em vista que seu crescimento é contínuo, mas na fita retardada vários *primers* são necessários para iniciar cada fragmento de Okazaki. Quando um fragmento de Okazaki se liga a outro, o primer de RNA é removido antes da ligação entre os dois pela DNA ligase.

Por que a DNA polimerase não consegue começar a replicação

A DNA polimerase só pode adicionar novos nucleotídeos a uma fita já formada e adequadamente pareada a outra fita, ou seja, a um nucleotídeo ligado a outro na fita por ligação fosfodiéster e ligado a outro na fita complementar por pontes de hidrogênio. A vantagem disso é que, qualquer ligação incorreta de nucleotídeo, gera um nucleotídeo não pareado, ao qual a DNA polimerase não poderá adicionar um novo nucleotídeo para continuar a síntese numa cadeia com defeito.

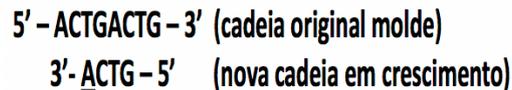
Toda vez que um nucleotídeo inadequado (não complementar) é adicionado à fita em crescimento, não há pareamento e, conseqüentemente, não há formação de pontes de hidrogênio, de modo que a DNA polimerase interrompe sua atividade. Assim, uma parte da DNA polimerase, a **exonuclease de correção 3'5'**, remove os nucleotídeos não pareados até haver nucleotídeos pareados corretamente para a DNA polimerase prosseguir com a replicação, num processo conhecido como autocorreção da DNA polimerase.

Como a DNA polimerase só pode adicionar novos nucleotídeos a uma fita já formada e adequadamente pareada a outra fita, ela não pode adicionar o primeiro nucleotídeo a ser pareado, o que passa a ser feita pela DNA primase com seu primer de RNA. A DNA primase não precisa ligar nucleotídeos a um nucleotídeo já pareado ligado a uma fita já pareada, podendo então iniciar a replicação.

A DNA primase não possui o mecanismo de autocorreção da DNA polimerase, mas nem precisa: não há necessidade de corrigir RNA porque ele não é hereditário, além de que o *primer* é removido. Essa diferença entre a produção de DNA com reparos e a de RNA sem reparos justifica a taxa de erros do DNA ser de 1/10⁹ e do RNA de 1/10⁴, bem maior!

A replicação só funciona no sentido 5'3'

Como as duas fitas do DNA são antiparalelas, estando uma no sentido 5'-3' e outra no sentido 3'-5', a síntese de DNA na forquilha exigiria duas DNA polimerases diferentes, uma que procedesse a polimerização no sentido 3'-5' e outra que a procedesse no sentido 5'-3'. Entretanto, a DNA polimerase, como qualquer outra enzima, é específica, e **só pode adicionar novos nucleotídeos na fita que cresce no sentido 5'-3'**, em outras palavras, novos nucleotídeos só podem ser adicionados pelo lado da pentose (extremidade 3'), nunca pelo lado do fosfato (extremidade 5'). Isso ocorre, porque a energia necessária para a realização de uma ligação fosfodiéster vem do fosfato do novo nucleotídeo adicionado: assim, o nucleotídeo é ligado pelo seu grupo fosfato à pentose na extremidade 3'.



Um novo nucleotídeo só pode ser adicionado à cadeia em crescimento do lado esquerdo, ao nucleotídeo de adenina sublinhado: nesse caso, o fosfato do novo nucleotídeo adicionado (que deve ser G, para parear com C da cadeia molde) deve ser ligado à pentose do nucleotídeo de adenina em sua extremidade 3, e nunca ao nucleotídeo de guanina em sua extremidade 5'.

Por que a replicação só funciona no sentido 5'3'

A energia para a adição do nucleotídeo à cadeia em crescimento é dada pelos fosfatos do nucleotídeo a ser adicionado, de modo que ele tem que encaixar na extremidade 3', porque os fosfatos estão na extremidade 5'.

A síntese de DNA é descontínua em cadeia

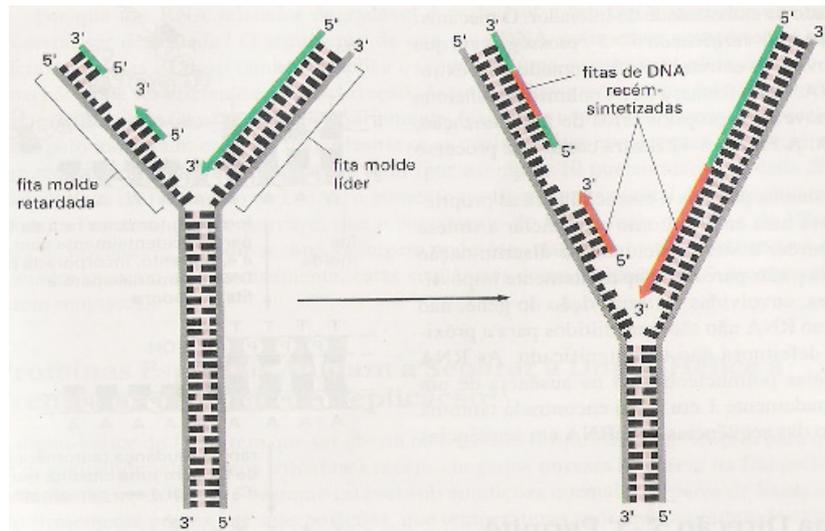
Ao produzir as duas novas fitas na forquilha de replicação, ocorre um problema: a fita molde 3'-5' produzirá uma fita filha que cresce no sentido 5'-3', que é o correto, mas a fita molde 5'-3' produzirá uma fita filha que deveria crescer no sentido 3'-5', o que não é possível. Na verdade, a fita filha que cresce no sentido correto 5'-3' cresce de **modo contínuo**, e é chamada de **fita líder** ou **adiantada**. Já a fita filha que deveria crescer no sentido 3'-5' cresce de modo descontínuo, em pedaços denominados **fragmentos de Okazaki**, e é chamada de **fita retardada**. Fragmentos de Okazaki são compostos por 1000 a 2000 nucleotídeos em bactérias e por 100 a 200 nucleotídeos em eucariontes.

Quando a forquilha de replicação se abre, quebrando as pontes de hidrogênio e separando as duas fitas molde, a fita líder cresce de modo direto, mas a fita retardada não. Apenas depois que várias pontes de hidrogênio já foram quebradas, e a fita líder já cresceu o suficiente no sentido 5'-3', é que um fragmento de Okazaki da fita retardada passa a ser produzida no sentido contrário, voltando em direção à origem de replicação: se a fita retardada crescesse a partir da origem de replicação, cresceria no sentido 3'-5', o que, como dito, não é possível; assim, a fita retardada é produzida em pedaços voltando à origem de replicação para poder crescer no sentido correto 5'-3'.

Quando o fim de um fragmento de Okazaki encontra o início de outro fragmento de Okazaki, eles se ligam por uma enzima diferente da DNA polimerase. Essa enzima é a **DNA ligase**.

Quando um fragmento de Okazaki encontra o início de outro fragmento de Okazaki mais antigo, uma enzima RNAaseH, que reconhece fitas híbridas RNA/DNA, remove o primer, e a DNA polimerase continua a replicação. Ao encontrar os desoxirribonucleotídeos do fragmento de Okazaki mais antigo, a enzima **DNA ligase** liga os dois fragmentos. A partir da origem de replicação, produz-se uma cadeia líder e uma cadeia retardada que crescem em velocidades diferentes, de modo que a forquilha de replicação é **assimétrica**.

Em procariontes, os fragmentos de Okazaki têm cerca de 1000 a 2000 nucleotídeos de comprimento, enquanto que em eucariontes, eles têm cerca de 100 a 200 nucleotídeos de comprimento.



Forquilha de replicação.

Telômero e enzima telomerase

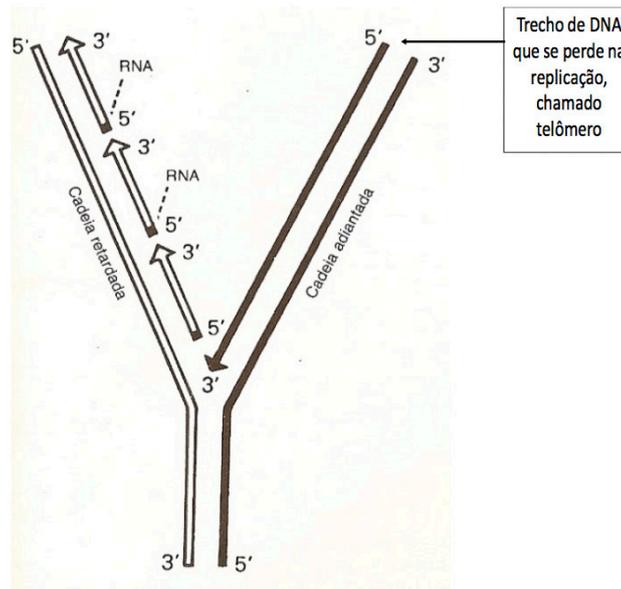
Nas extremidades da molécula de DNA, o modo de ação da DNA polimerase traz um problema: o primer de RNA não pode ser substituído por DNA no trecho inicial da cadeia líder (observe a seta no esquema abaixo), uma vez que isso teria que ser feito no sentido 3'5', o que não é possível. Como o primer de RNA é muito instável, ele se perde, e o trecho complementar de DNA também se perde. Assim, o DNA filho é ligeiramente mais curto que o DNA parental.

Esse pequeno trecho de DNA perdido na extremidade da molécula é parte do **telômero**. Telômero é a extremidade do cromossomo, e tem o papel de evitar que as extremidades do cromossomo sejam interpretados como DNA lesado que deve ser reparado. A sequência de nucleotídeos do telômero é de DNA não codificante, consistindo de até 3.300 repetições da sequência TTAGGG. Isso é importante, pois como parte dele deixa de ser copiado a cada ciclo de replicação do DNA, se houvesse nele algum gene importante, seria danificado.

A princípio, o encurtamento do DNA pela diminuição do telômero não traz problemas, uma vez que envolve trechos de DNA não codificante. Entretanto, após várias divisões celulares e consequentes replicações, a molécula de DNA está tão encurtada que passa a não ter trechos de alguns genes, o que leva a célula à morte. Em humanos, calcula-se em cerca de 40 a 50 divisões celulares o número de divisões a partir do qual a célula morre. Esse número de vezes máximo que uma célula pode se reproduzir até que morra é conhecido como **limite de Hayflick**. Essa impossibilidade de as células se reproduzirem de modo indefinido é uma das explicações para o envelhecimento tecidual.

Em células indiferenciadas (células tronco), células germinativas e células cancerosas, a ocorrência da enzima telomerase permite a reconstrução desses telômeros após cada replicação do DNA, renovando-os. Assim, as células filhas após a divisão celular terão telômeros normais, consequentemente possibilidade de infinitos ciclos de replicação de DNA e divisão.

Tome nota:



DNA helicases e DNA topoisomerases

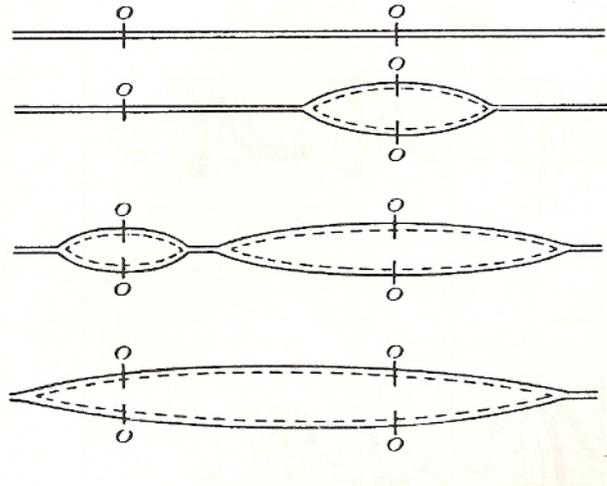
Outras enzimas fundamentais para a replicação são as **DNA helicases** e a **DNA topoisomerases (ou DNA girases)**. As DNA helicases quebram as pontes de hidrogênio entre as duas fitas moldes, expondo-as para o pareamento de novos nucleotídeos. Assim, as DNA helicases agem como uma alavanca para abrir a dupla-hélice na forquilha de replicação. Já as DNA topoisomerases, são enzimas que impedem que o DNA se emaranhe durante a replicação, o que deveria acontecer devido à sua estrutura espacial. Assim, as DNA topoisomerases desenrolam o DNA durante a replicação para evitar esse problema.

A síntese de DNA tem múltiplos locais de origem e é bidirecional

A forquilha de replicação tem origem numa região denominada de bolha de replicação, um local específico para a separação das duas fitas moldes. Essas bolhas de replicação se originam a partir de sequências especiais denominadas **origens de replicação**, de até 300 nucleotídeos.

Para o início da replicação, proteínas iniciadoras ligam-se a sítios específicos de origens de replicação, envolvendo o DNA em sua volta para formar um grande complexo DNA-proteína. Este complexo liga-se então à DNA helicase, e a carrega para uma DNA fita simples exposta em uma região da hélice adjacente. A DNA primase também se liga, e origina o RNA primer que origina a primeira cadeia de DNA. O referido processo cria dois complexos proteicos que se afastam da origem de replicação em direções opostas; estes complexos continuam a sintetizar o DNA até que todo o molde de DNA em cada forquilha seja duplicado. Como a replicação se processa a partir da origem nos dois sentidos, ela é dita **bidirecional**. (Perceba que a partir da origem de replicação, partem uma fita líder e uma fita retardada em cada sentido.)

A presença de múltiplos locais de origem e a bidirecionalidade da síntese dão um aspecto bem particular ao DNA que se duplica, com **bolhas de replicação**, trechos com forquilhas de replicação nas duas extremidades.

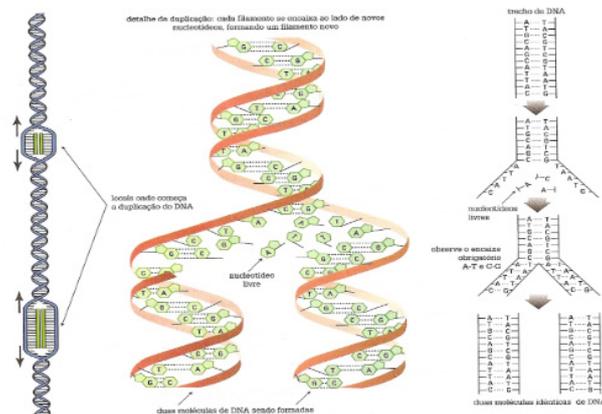


De cima para baixo, em sequência: locais de origem demarcados com "O"; bolha de replicação se iniciando no local de origem à direita; expansão da bolha de replicação à direita e bolha de replicação se iniciando no local de origem à esquerda; bolhas de replicação se unindo.



Fotomicrografia eletrônica de bolha de replicação; os grânulos são nucleossomos.

A vantagem dos múltiplos locais de origem e da bidirecionalidade da replicação, está num **ganho de velocidade de replicação**. Como o DNA é muito longo, um único local de origem implicaria numa grande lentidão no processo de replicação. Em eucariontes, ocorrem origens de replicação em intervalos menores do que ocorre em procariontes, de modo que o ganho de velocidade é maior em eucariontes. Assim, mesmo o DNA eucarionte sendo maior, sua replicação é mais veloz.



Reparo de DNA

Existem vários tipos de reparo de DNA defeituoso, o que pode prevenir a consolidação de mutações. No caso mais comum, quando somente uma das fitas do DNA apresenta defeito, a fita normal pode funcionar como guia para reparo da fita defeituosa. Alguns desses mecanismos de reparo incluem:

- **Reparo de pareamentos errados** (“*Mismatch repair*”), que corrige erros na replicação do DNA e no crossing-over que resulta em pareamento inadequado dos nucleotídeos. De modo resumido, a fita parental normal é metilada e a fita filha defeituosa não é metilada, de modo que a metilação funciona como indicação da fita que não deve ser reparada: a fita de DNA não metilada é degradada na área de pareamento inadequado através de um complexo enzimático (envolvendo enzimas como a mut S, a mut L e a mut H) e é replicada novamente por ação das enzimas normais da replicação, como a enzima DNA polimerase.

- **Reparo por excisão de bases** (BER, na sigla em inglês), que corrige erros em nucleotídeos decorrentes de oxidação, alquilação, hidrólise ou desaminação. Este processo é conduzido por enzimas DNA glicosilases que reconhecem, por exemplo, citosinas e adeninas desaminadas que geram moléculas como uracila no DNA. As enzimas DNA glicosilases removem a base lesada pela quebra da ligação N-glicosil que liga a base nitrogenada na desoxirribose. Após a retirada da base lesada, gera-se no DNA um sítio “AP” (apurínico, sem purina, ou apirimidínico, sem pirimidina) que será reparado por enzimas AP endonucleases, que quebram o esqueleto fosfato-desoxirribose na região do sítio AP, e a enzima DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase), que remove o grupo desoxirribose e fosfato no sítio AP, para que então a enzima DNA polimerase possa reconhecer e complementar a lacuna gerada pela retirada do nucleotídeo danificado, fazendo o pareamento com um nucleotídeo normal. Note que, nesse caso, não é necessário sinalizar qual é a fita parental e qual é a fita nova, uma vez que não há erro no pareamento, mas bases nitrogenadas defeituosas.

- **Reparo por excisão de nucleotídeos** (NER, na sigla em inglês), que remove blocos de nucleotídeos em regiões submetidas a grandes alterações, como, por exemplo, a formação de dímeros de timina pela ligação covalente em duas timinas vizinhas no DNA devido à ação da radiação UV. De modo geral, esse processo envolve a quebra da fita de DNA danificada nas extremidades da lesão, mas em regiões relativamente distantes da mesma, o que é feita por enzimas endonucleases, seguida pela remoção do trecho lesionado de DNA e síntese de um novo trecho correto de DNA pela enzima DNA polimerase.

Observação: Enzimas DNA exonucleases removem nucleotídeos nas extremidades de moléculas de DNA, enquanto que enzimas DNA endonucleases removem nucleotídeos no meio de moléculas de DNA.

Tome nota:

LEITURA COMPLEMENTAR

Identificação da estrutura do DNA

A natureza química dos genes

Um passo importante para a compreensão do funcionamento dos genes foi a identificação de sua natureza química, o que ocorreu no final dos anos 1940, quando se descobriu que os genes são formados por DNA.

A sigla DNA, que designa o ácido desoxirribonucleico, tomou-se amplamente conhecida nas duas últimas décadas, principalmente devido à popularização dos exames para identificação de paternidade duvidosa. No meio científico, porém, essa sigla já era bem conhecida desde o início da década de 1950, quando ficou comprovado que o ácido desoxirribonucleico é o material que constitui os genes.

Nas últimas cinco décadas, os progressos no estudo do DNA foram enormes: determinou-se sua estrutura molecular, o código genético foi desvendado; descobriu-se como as informações codificadas no DNA são traduzidas em mensagens que controlam o funcionamento celular. Além disso, foram desenvolvidas sofisticadas técnicas de análise e de manipulação de moléculas de DNA, que levaram à criação de novos campos de pesquisa e de novas tecnologias. O estopim de toda essa revolução nos conhecimentos genéticos foi a publicação na revista científica inglesa *Nature*, em 25 de abril de 1953, do artigo intitulado *Molecular structure of nucleic acid: a structure for deoxyribose nucleic acid* de autoria dos então jovens pesquisadores James Watson (n.1928) e Francis Crick (1916-2004).

A descoberta do DNA

A história do DNA começa no final da década de 1860, com a chegada do médico suíço Friedrich Miescher (1844-1895) à Universidade de Tübingen, pacata cidade no sul da Alemanha. O jovem pesquisador estava disposto a dedicar-se ao estudo da química da célula e escolheu essa universidade porque nela o químico Felix Hoppe-Seyler (1825-1895) havia inaugurado um importante laboratório de química fisiológica. Na época floresciam ideias a respeito das origens e das funções das células. Há pouco tempo, a teoria da geração espontânea havia sido definitivamente desacreditada. A teoria celular estabelecia-se como um dos pilares da Biologia. Por tudo isso, as células atraíam a atenção de estudantes entusiasmados, como Miescher.

Felix Hoppe-Seyler foi quem primeiro descreveu as interações entre a hemoglobina, a proteína responsável pela cor vermelha do sangue, e o gás oxigênio. Seu trabalho levou-o a interessar-se pelo pus, cujas células constituintes assemelham-se aos glóbulos brancos presentes na circulação sanguínea. Foi por sugestão de Hoppe-Seyler que Miescher começou a estudar a química das células do pus; o material para a pesquisa era abundante, pois dezenas de bandagens com material purulento eram diariamente descartadas por um hospital próximo à universidade. Miescher trabalhou para desenvolver técnicas adequadas à retirada das células de pus das bandagens e à sua preparação para a análise química. O objetivo inicial era investigar as proteínas nas celulares, um grupo de substâncias descoberto cerca de 30 anos antes.

Em um de seus muitos experimentos com células do pus, Miescher obteve um precipitado que diferia quimicamente de todas as substâncias protéicas conhecidas. Ele descobriu que a nova substância se concentrava no núcleo celular, na época considerado uma estrutura de pouca importância para o funcionamento da célula. Aprimorando os métodos de extração e purificação da nova substância, Miescher demonstrou que, além de estar nas células do pus, ela também estava presente em materiais tão diversos quanto o rim, o fígado, o testículo, a levedura e as hemácias nucleadas das aves.

A análise química mostrou que as quantidades relativas dos elementos hidrogênio (H), carbono (C), oxigênio (O) e nitrogênio (N) presentes na nova substância diferiam das encontradas em proteínas; além disso,

a substância descoberta continha o elemento fósforo (P), ausente em moléculas protéicas. Convencido de que havia realmente descoberto uma nova substância, Miescher denominou-a nucleína, pelo fato de ela estar concentrada no núcleo das células.

O trabalho sobre a nucleína só foi publicado em 1871, após certa resistência do editor da revista científica, o próprio Hoppe-Seyler, que, no início, não acreditou nos resultados apresentados por Miescher. Mesmo depois da publicação do trabalho, muitos pesquisadores continuaram duvidando da existência da nucleína; na opinião deles, o achado de Miescher devia ser uma mistura de fosfatos inorgânicos e proteínas.

A elucidação da composição química do DNA

As desconfianças quanto à real existência da nova substância descrita por Miescher só foram superadas por volta de 1889, quando Richard Altmann (1852-1900) obteve preparações altamente purificadas de nucleína, sem nenhuma contaminação por proteínas. Pelo fato de a substância ter caráter ácido, o que já havia sido detectado por Miescher, Altmann sugeriu que ela fosse chamada de ácido nucleico em vez de nucleína.

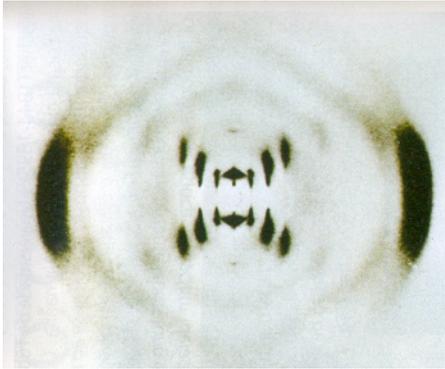
Outro pesquisador pioneiro na descoberta dos ácidos nucléicos foi Albrecht Kossel (1853-1927). Em 1877, ele juntou-se ao grupo de pesquisa de Hoppe-Seyler, então trabalhando na Universidade de Estrasburgo (França), e começou a estudar a composição química das nucleínas de diferentes tipos de células. Entre os produtos da degradação química da nucleína, Kossel detectou dois tipos de bases nitrogenadas já conhecidas, a adenina e a guanina. Em 1893, ele identificou uma nova base nitrogenada, que era liberada pela degradação de nucleína de células do timo; por isso, denominou-a timina. Logo em seguida, descobriu que a nucleína continha um quarto tipo de base nitrogenada, a qual denominou citosina. Em 1894, o grupo liderado por Kossel descobriu que os ácidos nucléicos continham também pentose, um açúcar com cinco átomos de carbono.

Em 1909, Phoebis Levine (1869-1940) e Walter Jacobs (1883-1967) conseguiram determinar a ordem em que as moléculas de fosfato, de pentose e de base nitrogenada estavam unidas no ácido nucleico, formando sua unidade fundamental, o nucleotídeo. Em 1930, Levine e colaboradores identificaram a pentose componente do ácido nucléico das células do timo, que denominaram 2-deoxi-D-ribose, pelo fato de ela possuir, no carbono 2 de sua cadeia, um átomo de oxigênio a menos que a ribose, uma pentose já conhecida, encontrada pelos pesquisadores em ácidos nucléicos extraídos de levedura. Ficaram então caracterizados dois tipos de ácidos nucléicos: o ácido ribonucleico, ou RNA (do inglês *ribose nucleic acid*), cujo açúcar é a ribose, e o ácido desoxirribonucleico, ou DNA (do inglês *deoxyribose nucleic acid*), cujo açúcar é a desoxirribose. No nucleotídeo, o fosfato está unido ao carbono 5' da pentose, enquanto que a base nitrogenada está unida ao carbono 1'. Concluiu-se também, que os nucleotídeos unem-se uns aos outros por ligações entre o fosfato do carbono 5' da pentose de um nucleotídeo e do carbono 3' da pentose do outro, formando uma cadeia polinucleotídica com uma extremidade 5' e outra 3'.

No final da década de 1940, alguns indícios sugeriam que o DNA deveria ser a substância constituinte dos genes. Isso fez com que muitos cientistas voltassem sua atenção ao estudo das moléculas dessa substância, na tentativa de identificar os detalhes da estrutura química do material genético e desvendar os segredos da hereditariedade.

A estrutura helicoidal do DNA

Apesar de as moléculas de DNA serem grandes quando comparadas a moléculas inorgânicas, elas são pequenas demais para que seus detalhes sejam visualizados, mesmo ao microscópio eletrônico. Entre-tanto, no final da década de 1940, os biofísicos já dispunham de um método eficiente para estudos da estrutura molecular, a difração de raios X. Os resultados obtidos com essa técnica, pela pesquisadora Rosalind Franklin (1920-1958) no laboratório de H. F. Wilkins (1916-2004), permitiu concluir que a molécula de DNA tem estrutura helicoidal (semelhante a uma mola espiral) com 2 nm (0,000002 mm) de espessura.



Padrão de difração de raios X de uma amostra cristalina de DNA. Esse padrão é obtido por meio de bombardeamento com raios X da amostra de DNA que se quer analisar. Ao atravessar a amostra, os raios são desviados de acordo com a estrutura molecular da substância; os raios X difratados atingem uma chapa fotográfica, formando um padrão de imagem que é registrado e analisado por um especialista.

A relação $A/T = C/G = 1$

Outra importante descoberta em relação à composição do DNA foi feita pelo pesquisador austríaco Erwin Chargaff (1905-2002). Ele verificou que, em qualquer DNA estudado, a quantidade da base adenina era sempre igual à quantidade de timina e que a quantidade de citosina era sempre igual à de guanina ($A/T = C/G = 1$). Qual seria o significado dessas equivalências entre as bases, nas moléculas de DNA?

O modelo de Watson e Crick

As informações disponíveis sobre o DNA, no começo de 1950, eram como peças desconstruídas de um quebra-cabeça. Reunindo-as de modo coerente, o biólogo James D. Watson e o físico Francis H. C. Crick elaboraram o modelo da dupla-hélice para a molécula de DNA.

Segundo esse modelo, hoje amplamente aceito, a molécula de DNA é composta por duas longas cadeias paralelas, constituídas por nucleotídeos dispostos em sequência. Essas duas cadeias polinucleotídicas são rigorosamente complementares: se houver uma adenina em uma das cadeias, haverá, na outra cadeia, na mesma posição, uma timina. Da mesma forma, se houver uma citosina em uma das cadeias, haverá uma guanina na posição correspondente da cadeia complementar. Os nucleotídeos de uma das cadeias da molécula de DNA mantêm-se unidos aos nucleotídeos da outra cadeia por ligações de hidrogênio estabelecidas entre as bases: a adenina liga-se especificamente à timina, e a citosina liga-se especificamente à guanina.

O modelo da dupla-hélice de Watson e Crick foi prontamente aceito pela comunidade científica; ele explicava pelo menos três características fundamentais do material genético: a capacidade de duplicação, a capacidade de conter informações para a produção de proteínas e a capacidade de sofrer mutação. Em 1962, Watson, Crick e Wilkins, este último um dos responsáveis pelas análises da difração de raios X do DNA, ganharam o Prêmio Nobel em Medicina ou Fisiologia por seus trabalhos sobre a estrutura da molécula. Rosalind Franklin foi excluída do prêmio porque já havia falecido na época, e o prêmio Nobel só é concedido a pessoas vivas.

Extraído de Amabis & Martho, Biologia das Populações.

Tome nota: