

FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DA HEREDITARIEDADE - II

Transmissão do material Hereditário (*)

Paulo A. Otto (**)

2) TRANSMISSÃO DO MATERIAL HEREDITÁRIO

a) DUPLICAÇÃO DO DNA

Num organismo superior, o DNA está localizado nos cromossomas das células (a disposição nêles ainda constitui assunto bastante controverso, parecendo, no entanto, ue está disposto aos pedaços fragmentados), associado a histonas e protaminas e dando a reação citológica (Feulgen) característica.

Antes de ocorrer a divisão celular, a célula trata de duplicar, durante os períodos pré-mitóticos ou pré-meióticos, os seus cromossomas, e foi observado que

justamente nêses períodos ocorre uma duplicação da quantidade de DNA; foi notado igualmente que a quantidade de DNA nas células diplóides ($2n$ cromossomas) é exatamente igual ao dôbro da quantidade de DNA das células haplóides (n cromossomas), ou gametos, de um mesmo organismo. Todos êses fatos, por sua vez, vêm comprovar ser realmente o DNA o material responsável pelo aparecimento e pela transmissão dos caracteres biológicos.

Assim, o ciclo vital dos organismos pluricelulares que se reproduzem sexualmente poderia ser representado pelo esquema da figura 7, onde representa uma quantidade qualquer de DNA (fixa e característica para cada espécie).

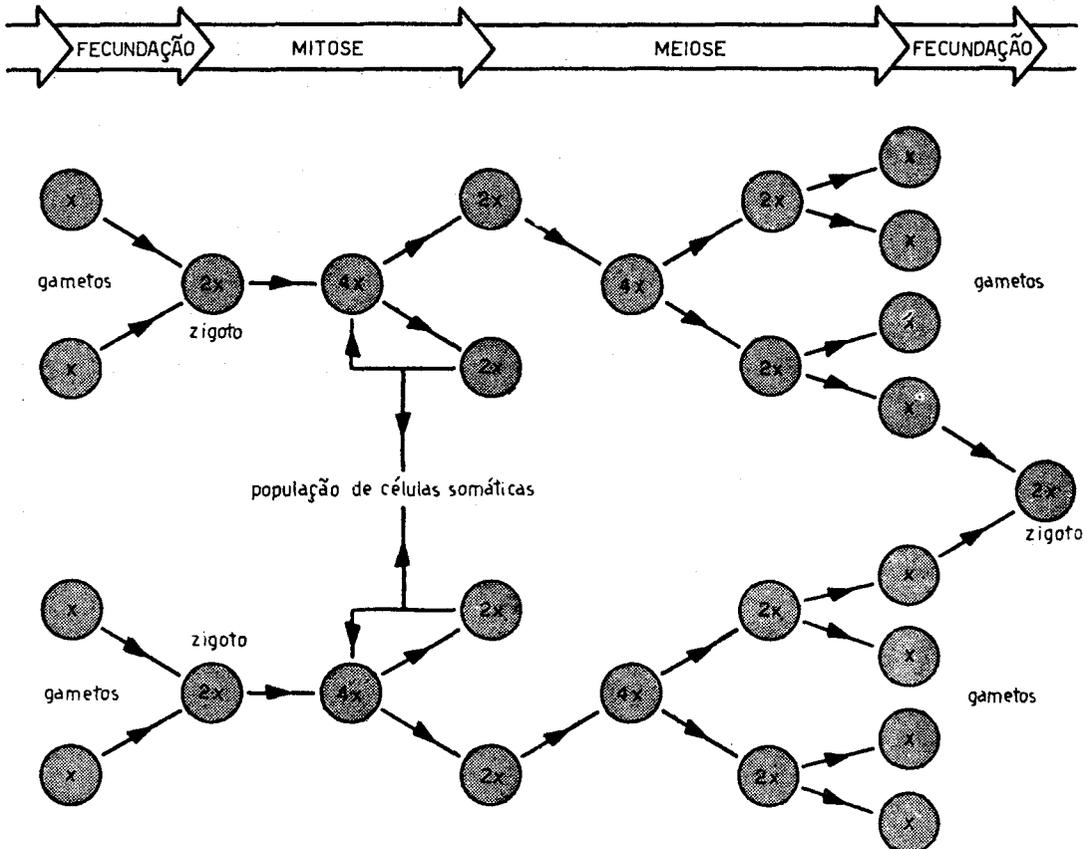


Fig. 7

(*) — Trabalho do Serviço de Pesquisas e Experimentação do Instituto Nacional do Câncer — Seção de Imunologia e Seleção de Animais de Laboratório (Chefe: Dr. Sylvio Thales Tôrres).

(**) — Professor Conferencista de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da U.E.G. — Médico do Serviço de Pediatria do Hospital de Aeronáutica do Galeão.

Desde já fica estabelecido que a transmissão do material hereditário de célula a célula é conseguida de uma maneira eficaz pela duplicação da quantidade de DNA pré-existente na célula-mãe e pela distribuição dessa quantidade em duas partes iguais nas células-filhas.

O modelo de Watson & Crick explica, pela complementariedade existente entre as bases purínicas e pirimidínicas dos dois filamentos da molécula, a duplicação do DNA. Diga-se aliás de passagem, que Friedrick-Freksa, em 1940, sem ter um conhecimento da estrutura íntima do DNA mas já desconfiando de que fôsse essa substância a responsável pela transmissão exata dos caracteres biológicos, sugeriu, vislumbrando a evidente necessidade da autoduplicação, um modelo que essencialmente em nada difere do de Watson & Crick: o DNA seria formado por duas matrizes, uma molécula positiva e uma molécula negativa, a molécula positiva sendo capaz de servir como molde para a formação de uma molécula negativa, e a molécula negativa capaz de moldar uma positiva.

Numa fase imediatamente preliminar à duplicação do DNA, 5'-nucleotídios existentes no núcleo da célula e sintetizados previamente por esta a partir de nutrientes são ativados mediante conversão em 5'-trifosfonucleosídios na presença de ATP (trifosfato de adenosina) e de enzimas específicas (quinase do ácido 5'-desoxiadênico, quinase do ácido 5'-desoxicitidílico, quinase do ácido 5'-desoxiguanílico e quinase do ácido 5'-desoxitimidílico).

Segundo os estudos *in vitro* de Kornberg com uma enzima isolada de bactérias *Escherichia coli*, na fase de duplicação própria dita do DNA, os 5'-nucleotídios ativados sob a forma de 5'-trifosfonucleosídios são polimerizados pela DNA-polimerase, servindo como moldes para tal polimerização as duas hemimoléculas de um DNA previamente existente; cada hemimolécula origina uma que lhe é complementar em seqüência de bases e que corresponde exatamente à sua hemimolécula complementar primitiva. Esse comportamento justifica muito bem a denominação que Watson & Crick deram ao DNA: "a pair of templates".

Para exemplificar e ficar bem visualizada a maneira de duplicação do DNA, tome-se o seguinte esquema (fig. 8):

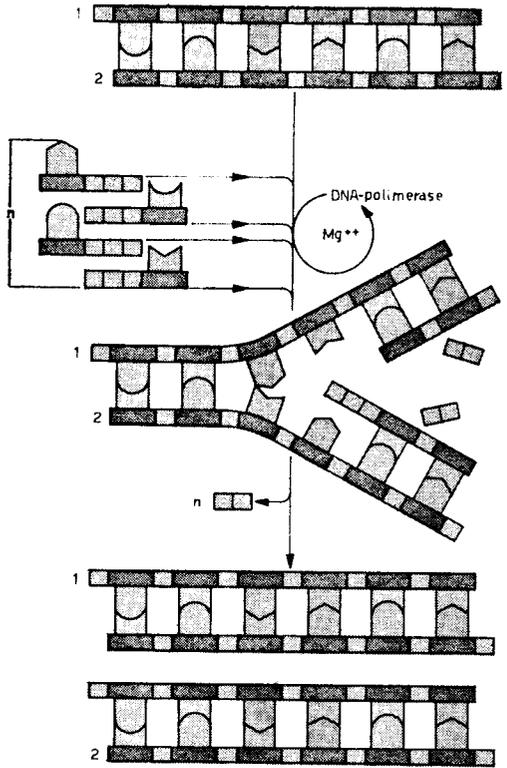


Fig. 8

Na parte superior do desenho está representado um trecho qualquer estirado da molécula do DNA, com as hemimoléculas 1 e 2 pareadas pelas ligações de ressonância que se estabelecem entre as bases complementares dos dois filamentos. No momento da duplicação (parte média do desenho) a molécula se abre, desfazendo-se as ligações de hidrogênio entre as bases complementares da molécula, o que resulta numa exposição destas.

Os 5'-trifosfodesoxirribonucleosídios existentes na vizinhança da molécula do DNA pareciam espontaneamente (através de suas bases) com as bases complementares expostas de cada hemimolécula do DNA—"primer" à medida que se processa a "abertura" e concomitantemente a enzima DNA-polimerase promove a sua incorporação sob a forma de 5'-nucleotídios (um após o outro, numa ordem que é ditada pela seqüência de bases complemen-

tares em cada hemimolécula do “templa-te”), liberando os dois últimos grupamentos fosfato de cada trifosfonucleosídeo (sob a forma de pirofosfato, que, a seguir, sob a ação da enzima pirofosfatase, será transformado em fosfato inorgânico e utilizado pela célula).

Como pode ser visto na parte média do desenho, numa das hemimoléculas a DNA-polimerase condensa o primeiro grupamento fosfato de cada trifosfonucleosídeo com a oxidrila do carbono 3' da pentose do trifosfonucleosídeo anterior, já incorporado sob a forma de nucleotídeo, e na outra hemimolécula promove a condensação da oxidrila do carbono 3' da pentose de cada trifosfonucleosídeo com o primeiro grupamento fosfato do trifosfonucleosídeo anterior já incorporado. Por aí se vê que em cada molécula de DNA, num dos filamentos as moléculas de cada resíduo de pentose estão orientadas na direção 5'→3', enquanto que no outro filamento os mesmos resíduos estão orientados na direção 3'→5'.

Na parte mais inferior do desenho tem-se a representação esquemática das duas porções de DNA, absolutamente iguais e geradas pelo processo de autoduplicação do segmento representado na parte mais superior. Em cada uma das moléculas-filhas, uma das hemimoléculas (1 e 2) fazia parte da molécula-mãe: daí essa duplicação receber o nome de semiconservativa, processo de duplicação este previsto pelo modelo de Watson & Crick.

A igualdade das seqüências de nucleotídios na molécula-mãe e nas moléculas-filhas constitui uma prova da semiconservação no processo de autoduplicação do DNA e pode ser demonstrada por meio de um engenhoso método idealizado por Kornberg. A DNA-polimerase promove, como foi visto, a polimerização de 5'-trifosfonucleosídeos e o DNA resultante é um copolímero formado pelo encadeamento de resíduos de 5'-nucleotídios; a digestão do DNA pela desoxirribonuclease fornece não esses 5'-nucleotídios, mas 3'-nucleotídios (fig. 9):

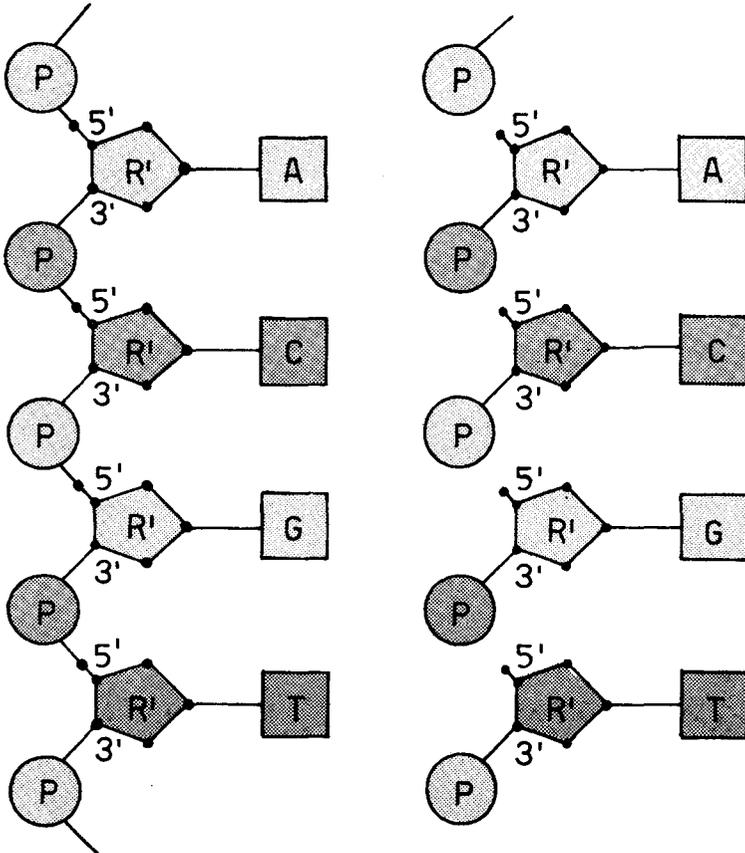


Fig. 9

Essa hidrólise não deixa de constituir, de certa maneira, um processo de transferência do grupamento fosfato de cada nucleotídeo para o nucleotídeo que lhe é imediatamente subsequente na molécula do DNA. Ao se marcar com P^{32} um dos quatro tipos de 5'-trifosfonucleosídeos (AR'PPP, CR'PPP, GR'PPP ou TR'PPP) a serem polimerizados pela DNA-polimerase, esse fósforo radioativo poderá ser detectado nos 3'-nucleotídeos obtidos pela hidrólise do DNA resultante com a desoxirribonuclease, e os 3'-nucleotídeos que contiverem P^{32} equivalerão aos 5'-nucleotídeos imediatamente subsequentes aos resíduos do tipo de 5'-nucleotídeo marcado na molécula do DNA digerido. Repetindo-se a experiência quatro vezes, usando de cada vez um tipo diferente de 5'-trifosfonucleosídeo marcado com P^{32} (por exemplo: da primeira vez, AR'PPP com P^{32} e os demais 5'-trifosfonucleosídeos — CR'PPP, GR'PPP, TR'PPP — com fósforo normal não-radioativo; da segunda vez, CR'PPP com P^{32} e os demais 5'-trifosfonucleosídeos — AR'PPP, GR'PPP, TR'PPP — com fósforo normal não-radio-

ativo; etc.), ter-se-á a composição completa do DNA, em termos de frequência de nucleotídeos vizinhos de cada um dos quatro tipos de nucleotídeos, e essa frequência é a mesma tanto na molécula-mãe como nas moléculas-filhas de cada tipo de DNA.

A primeira evidência experimental da semiconservação no processo de autoduplicação do DNA surgiu de uma experiência realizada em 1957 por Taylor: a uma cultura de células vegetais interfásicas foi administrada timidina (TR') tritiada, nucleosídeo radioativo precursor de DNA; quando as células entraram em divisão, as duas cromátides de cada cromossoma duplicado, observadas na metáfase, por meio da técnica da auto-radiografia, estavam radioativas; uma segunda mitose, na presença de colchicina (alcalóide que paralisa as figuras mitóticas na metáfase, por impedir a formação completa do fuso acromático) em meio não-radioativo, revelou radioatividade somente em uma das cromátides de cada cromossoma duplicado (fig. 10).

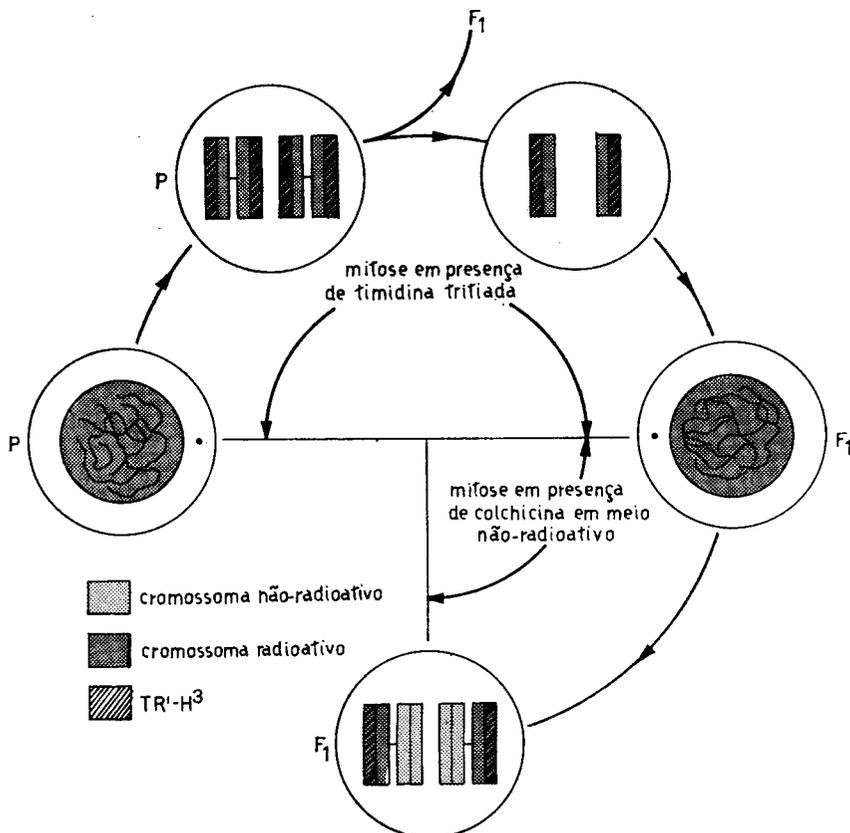


Fig. 10

Nesse desenho está representado esquematicamente sempre o mesmo par de cromossomas homólogos.

Esta experiência, além de demonstrar citologicamente a duplicação semiconservativa do DNA, prova também que, qualquer que seja a disposição do DNA nos cromossomas, ele se comporta como uma única molécula estirada longitudinalmente a esses (exceto, como ressalta Taylor, para casuais e raras trocas de segmentos de cromátides que foram observadas).

Em 1958, Meselson & Stahl conseguiram provar, a nível molecular, ser realmente semiconservativo o processo de autoduplicação do DNA: cultivaram bactérias *Escherichia coli* num meio de cultura cuja única fonte de nitrogênio era cloreto de amônio contendo o isótopo pesado do nitrogênio (N^{15}). Após várias gerações (quando então todos os compostos nitrogenados sintetizados pelas bactérias, inclusive o seu DNA, deveriam conter somente N^{15}), a fonte de nitrogênio foi substituída por cloreto de amônio contendo nitrogênio não-radioativo (N^{14}). Após essa substituição, o DNA de cada geração de bactérias foi analisado, em lisados destas, usando-se o método do equilíbrio de gradientes de densidade de centrifugação; foram identificadas, nas diversas gerações (fig. 11):

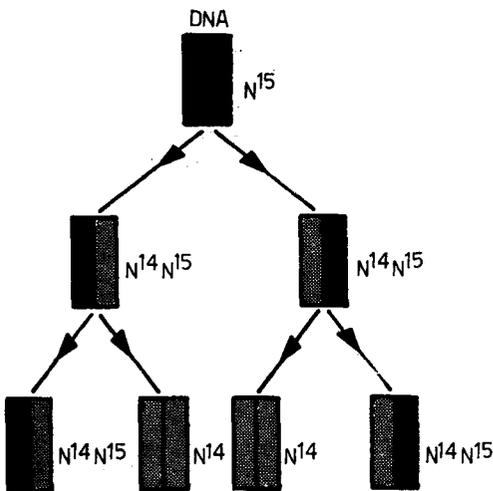


Fig. 11

a) moléculas “pesadas” de DNA contendo somente N^{15} (geração P);

b) moléculas “híbridas” de DNA contendo N^{14} e N^{15} em partes iguais (geração F_1);

c) moléculas “leves” de DNA contendo somente N^{14} e moléculas “híbridas” de DNA contendo N^{14} e N^{15} em partes iguais (geração F_2).

b) MUTAÇÕES A NÍVEL MOLECULAR

Enquanto a duplicação exata do DNA explicaria a transmissibilidade fixa dos caracteres biológicos, a duplicação “errada” dessa substância explicaria a ocorrência das mutações.

Foi dito que os caracteres biológicos estão condicionados à seqüência linear das bases nitrogenadas presas aos resíduos de nucleotídios na molécula do DNA; obviamente, uma alteração num par de bases qualquer provocaria uma alteração em toda a seqüência, e essa alteração teria sua gênese num pareamento anômalo de nucleotídios durante o processo de autoduplicação do DNA.

A ocorrência natural ou artificialmente induzida de mutações tem sido satisfatoriamente explicada pelo modelo de Watson & Crick.

A primeira das explicações para a ocorrência natural das mutações seria dada pelo fato de que as quatro bases comumente encontradas no DNA podem existir como tautômeros (isômeros apresentando estruturas que coexistem em estado dinâmico) raros.

Esses tautômeros de ocorrência muito rara pareciam de modo anômalo, como se pode ver na metade direita da figura 12.

Nesse mesmo quadro, na metade esquerda estão registrados os pareamentos normalmente possíveis dentro de uma mesma molécula de DNA; na metade direita, as bases em sua forma tautômera rara estão pareadas com as formas comuns.

As bases tautômeras raras podem estar presentes na molécula do DNA que vai servir como template para a formação de duas moléculas-filhas, ou então

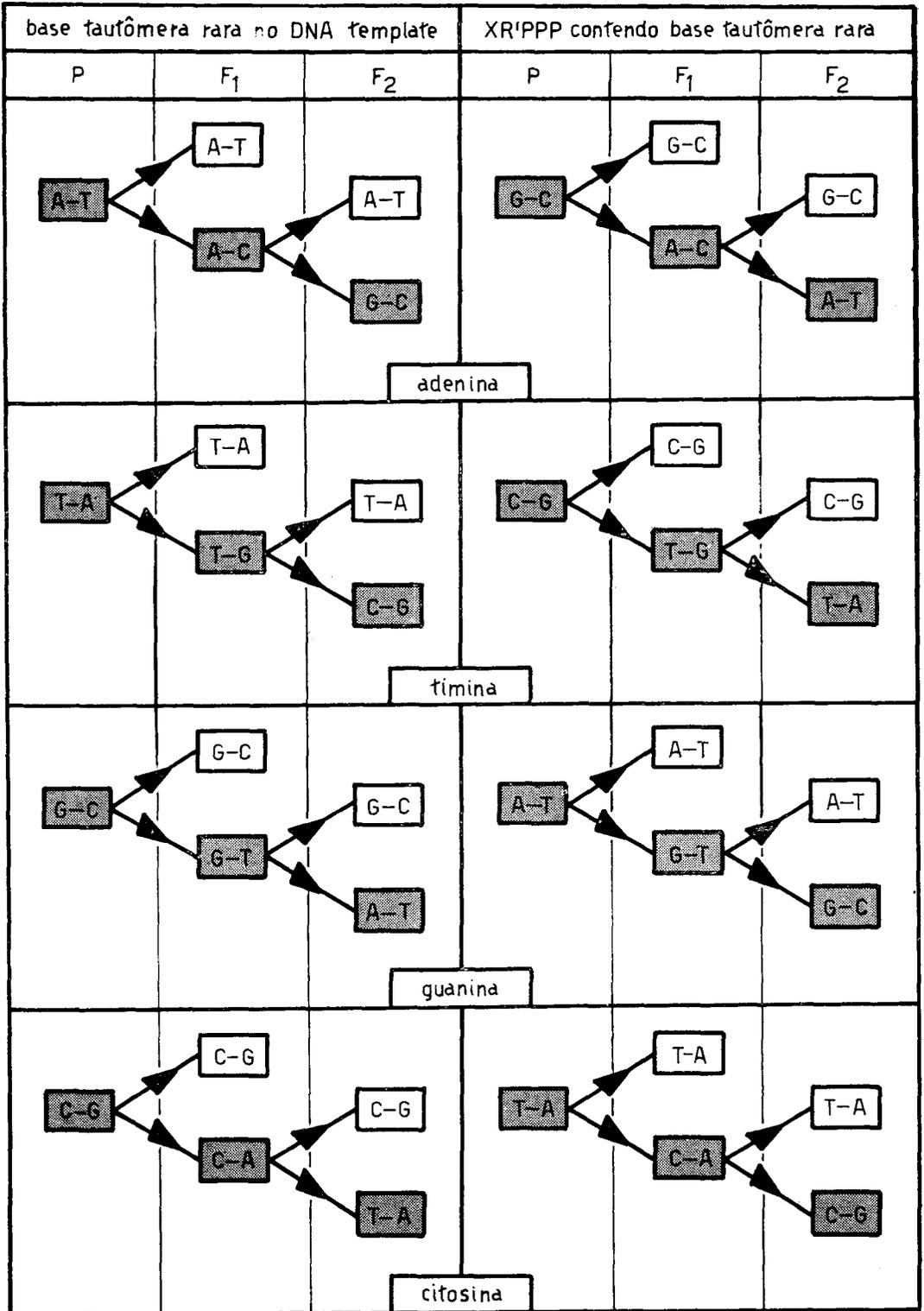


Fig. 13

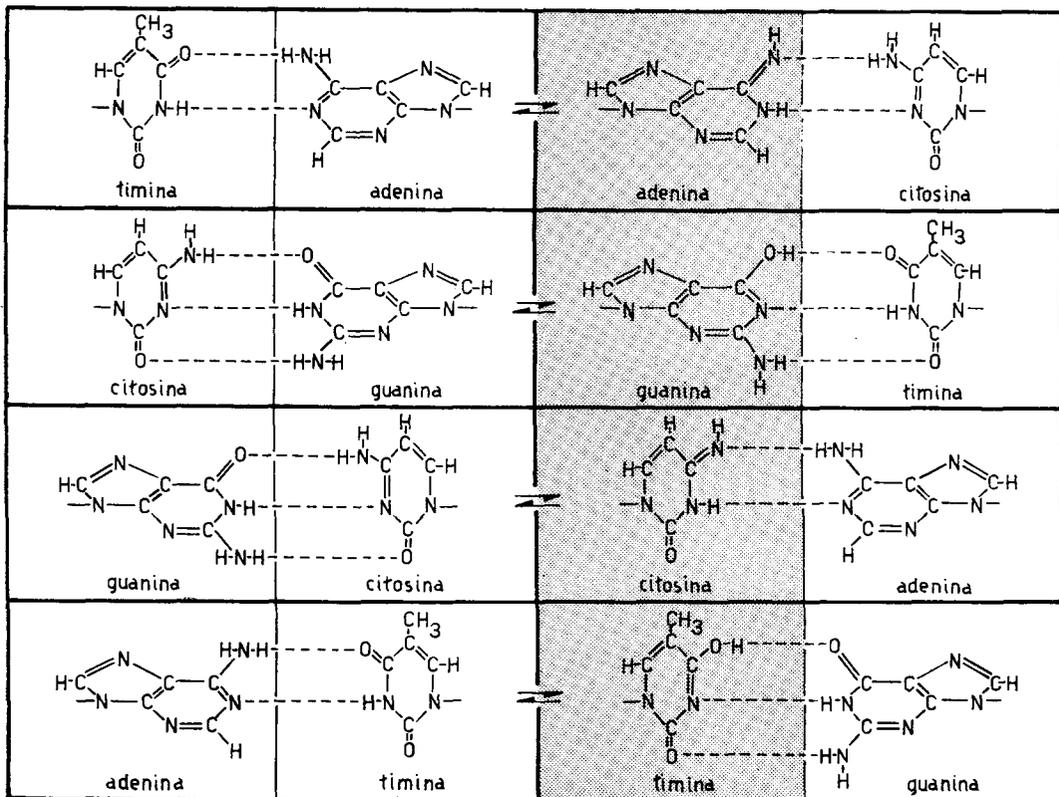


Fig. 12

nos trifosfonucleosídios que vão ser incorporados para a formação das novas hemimoléculas de DNA. Levando em conta esse fato, ter-se-ão as seguintes possibilidades de mutação (fig. 13).

As purinas podem também parrear-se, anômala-mente, com outras purinas, e as

pirimidinas com outras pirimidinas, dando origem às mutações esquematizadas na fig. 14a. A icnização do átomo de nitrogênio 1 da timina ou da guanina leva essas duas bases a um pareamento também anômalo, o que originaria as mutações seguintes (fig. 14b):

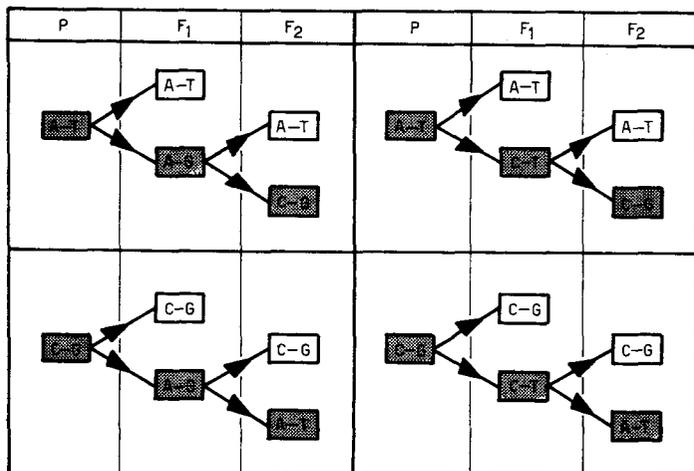


Fig. 14a

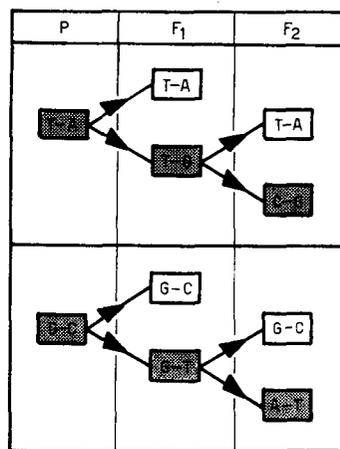


Fig. 14b

As mutações podem ainda ser induzidas artificialmente pela 5-bromo-uracila análogo-estrutural da timina que compete com esta durante o processo de autoduplicação do DNA; esta substância

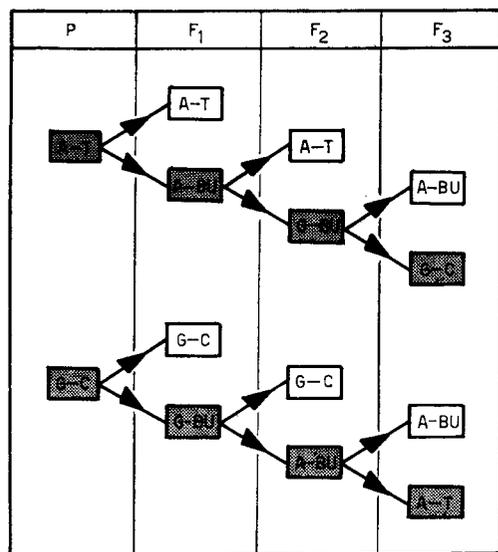


Fig. 15

ocorre com frequência relativamente alta numa forma tautômera capaz de parear com a guanina, o que explicaria o seu elevado poder mutagênico (fig. 15):

Admite-se que a mutação A-T→G-C se dá preferencialmente quando a 5-bromo-uracila faz parte do template (erro na duplicação), e que a mutação G-C→A-T se dá preferencialmente quando a 5-bromo-uracila faz parte do trifosfonucleosídeo precursor de DNA (erro na incorporação).

As mutações podem ser induzidas ainda pela reação do ácido nitroso com o DNA; essa substância transforma alguns dos resíduos de citosina em uracila (análogo-estrutural da timina) e resíduos de adenina em hipoxantina (base análogo-estrutural da guanina).

São possíveis ainda outros tipos de mutações a nível molecular, como substituição, deficiência e inserção de nucleotídios por mecanismos não ligados de maneira direta a problemas de pareamento, e que não serão discutidos aqui.

BIBLIOGRAFIA

a) DUPLICAÇÃO DO DNA

- 1 — BARRY, J. M., — "Molecular Biology: Genes and the Chemical Control of Living Cells", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1964.
- 2 — CAIRNS, J. — "The Bacterial Chromosome and its Manner of Replication as Seen by Autoradiography", J. Mol. Biol., 6:208 — 213, 1963.
- 3 — DE ROBERTIS, E. D. P., NOWINSKI, W. W., SAEZ, F. A., — "Biología Celular", El Ateneo, Buenos Aires, 1965.
- 4 — HOFSCHEIDER, P. H., — "La Herencia a Nivel Molecular", in Documenta Geigy, "Genética y Medicina", Basel, 1964, Pp. 2-4.
- 5 — KORNBERG, A., — "Biologic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid". Science, 131:1503 — 1508, 1960.
- 6 — LARA, F. J. S., MIRANDA, M. — "Bases Químicas da Hereditariedade", in Pavan, C., Cunha, A. B., "Elementos de Genética", Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1966, Pp. 18-36.
- 7 — MESELSON, M., STAHL, F. W., — "The Replication of DNA in Escherichia coli", Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 44:671 - 682, 1958.
- 8 — STAHL, F. W., — "The Mechanics of Inheritance", Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, 1965.
- 9 — TAYLOR, J. M., WOODS, P. S., HUCHES, W. L., — "The Organization and Duplication of Chromosomes as Revealed by Autoradiographic Studies Using Tritium-labeled Thymidine", Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 43: 122 - 128, 1957.

b) MUTAÇÕES A NÍVEL MOLECULAR

- 1 — CUNHA, A. B., — "Mutações", in Pavan, C. Cunha, A. B., "Elementos de Genética", Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1966, Pp. 94-117.
- 2 — FREESE, E., — "Molecular Mechanism of Mutations", in Taylor, J. H., "Molecular Genetics", Academic
- 3 — LEVINE R. P., — "Genetics", Tolt, Rinehart & Winston, New York, 1962.
- 4 — STAHL, F. W., — "The Mechanics of Inheritance", Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 1965.