

MUTAÇÃO E REPARO DE DNA

Prof. Ademilson Espencer E. Soares

A Natureza das Mutações.

Mutações que ocorrem naturalmente incluem todas mudanças imagináveis na seqüência de DNA.

As mutações que tem somente um efeito sutil no produto gênico, como as mutações para sensibilidade a temperatura, são freqüentemente simples trocas de uma base por outra.

Entretanto, algumas mutações naturais destroem completamente a função de um gene. Essas mudanças mais drásticas, chamadas **MUTAÇÕES NULAS**, incluem não somente mudanças de bases, inserções ou deleções de uma base, mas também, extensas inserções e deleções e mesmo rearranjos grosseiros na estrutura cromossômica.

Tais mudanças podem ser causadas, por exemplo, pela inserção de um transposon, o qual tipicamente transfere (insere) algumas centenas de pares de bases de um DNA estranho numa seqüência codificadora de um gene, ou por ações aberrantes do processo de recombinação celular.

Mutação pela Mudança de uma Única Base.

Existem inúmeras razões para se considerar primeiro o tipo mais simples de mutação, que muda uma base por outra.

Primeiro: a mudança de uma base reflete a básica fidelidade da replicação do DNA.

Segundo: alguns importantes mutagênicos atuam promovendo mudança em uma única base.

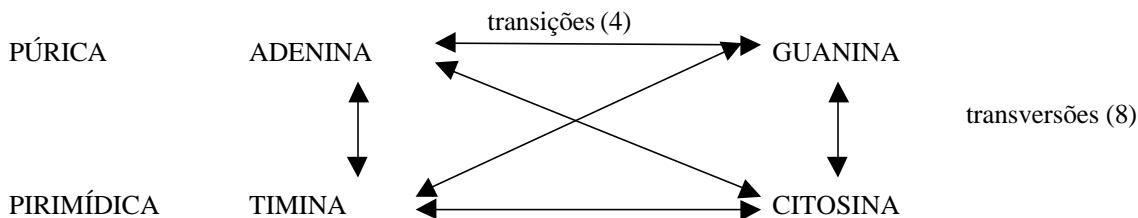
Finalmente, mutações numa única base são críticas para a evolução porque elas alteram o gene de uma maneira branda, produzindo variantes úteis, como no caso da siclemia (anemia falciforme).

Que tipos de mudanças de uma única base ocorrem naturalmente?

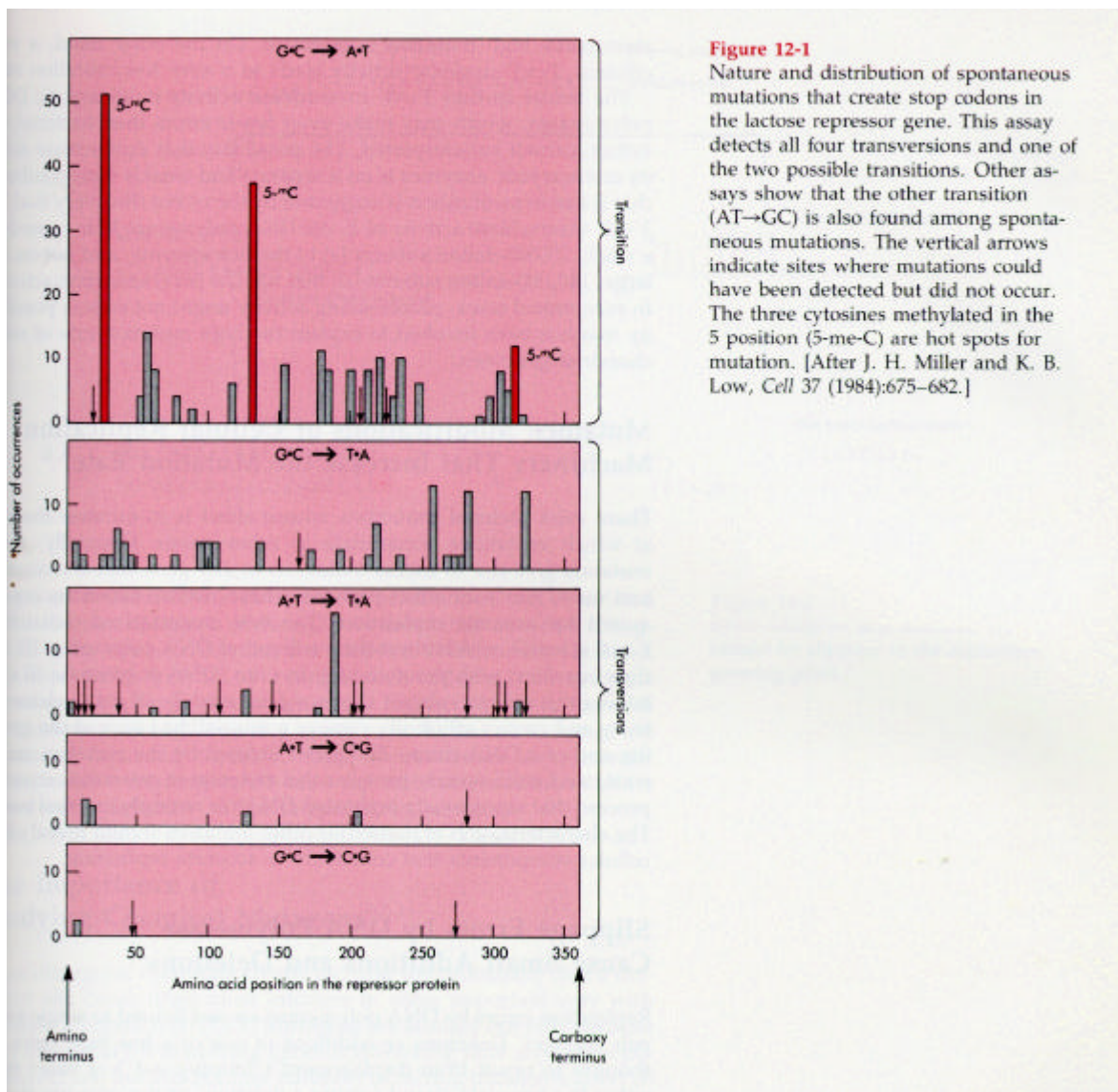
Observando a ocorrência de alterações nos códons de parada, para o gene lac I, que fabrica a proteína repressora no operon lactose, foi possível identificar os diferentes tipos de alterações que podem ocorrer em uma única base, como as:

TRANSIÇÕES – que são mudanças de base púrica por outra púrica, ou de uma base pirimídica por outra pirimídica.

TRANSVERSÕES – que são mudanças de uma base púrica por uma pirimídica ou vice-versa.



Um segundo fato importante é que nem sempre os possíveis sítios mutantes mutam com a mesma eficiência, alguns são “hot-spots” que são pontos onde as mutações ocorrem com uma freqüência mais alta (Figura 12.1).



As mudanças de uma base são comumente reversíveis e, freqüentemente, a taxa de **mutação reversa** (do mutante para a forma selvagem) são muito próximas da taxa de mutação do gene selvagem para o mutante.

A TAXA DE INCORPORAÇÃO ERRADA DE NUCLEOTÍDEO VARIA DE 10^{-7} A 10^{-11} .

Usando como referência a molécula repressora codificada pelo gene *lacI*, foi possível se estimar a taxa de incorporação errada de nucleotídeo, considerando-se 80 sítios distintos como sendo de aproximadamente 10^{-9} .

Entretanto, nas regiões de hot-spot, pode-se obter até 25 vezes mais mutantes.

CONTROLE DOS NÍVEIS MUTACIONAIS PELA RELATIVA EFICIÊNCIA DAS ATIVIDADES NUCLEÁSICA E DE POLIMERIZAÇÃO REALIZADA PELA DNA POLIMERASE.

De início, pode parecer que a freqüência de erros reflete diretamente a eficácia hereditária da formação dos pares de bases AT e CG.

Entretanto, fortes argumentos teóricos contradizem essa idéia: Não existe diferença suficiente entre um par de base certo ou errado, para que a polimerase cometa um erro para 10^9 nucleotídeos incorporados.

O limite inferior de uma inserção de base errada, pode ser dado pela frequência com que uma base assume a “incorreta” forma tautomérica (forma enol ao invés de cetônica, ou forma imino ao invés de amino), talvez uma em 10^4 , que é muito maior que a atual frequência de mutação.

Este dilema, entretanto, desapareceu quando se descobriu a capacidade “revisora” da DNA polimerase. Embora a frequência de erros iniciais durante a seleção do par de base seja consistente com as medidas das taxas tautoméricas, quase todas as inserções de bases erradas são, mais tarde, removidas pela atividade de exonuclease 3' - 5' da DNA polimerase.

De início, essa associação parecia bizarra, mas hoje sabe-se que esta atividade exonucleásica 3' - 5' é necessária para garantir a fidelidade da replicação do DNA.

Estudos com moléculas mutantes da DNA polimerase mostrou que as taxas de mutações pode ser controlada pela atividade exercida na direção 3' - 5', ou pela capacidade de polimerização realizada na direção 5' - 3'.

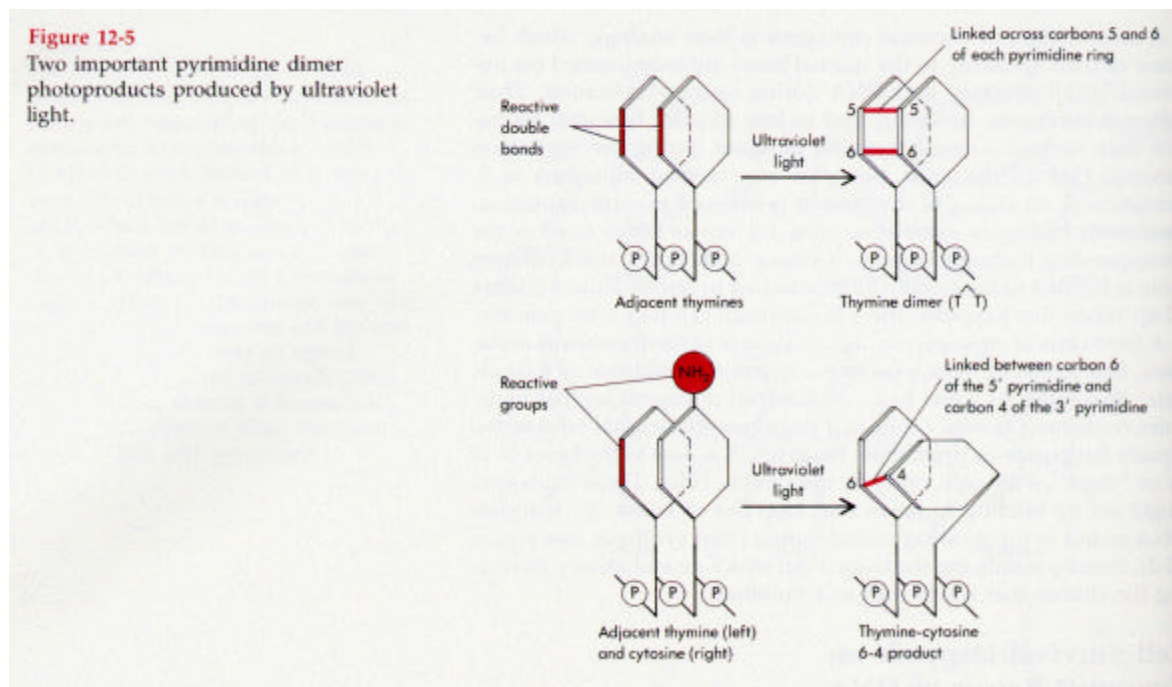
Se a capacidade exonucleásica no sentido 3' - 5' é ineficiente, então resultará uma alta taxa de mutação. Por outro lado, uma eficiente atividade exonucleásica produzirá uma baixa taxa de mutação.

Em *E. coli*, a atividade 3' - 5' exonucleásica exercida pela DNA polimerase III é conduzida numa pequena subunidade (ϵ) da holoenzima de, aproximadamente, 25.000 dáltons, enquanto a atividade de polimerização é conduzida pela subunidade (α) de 140.000 dáltons.

Em casos excepcionais, a atividade “revisora” da polimerase pode não existir e esta possibilidade tem sido aventada para explicar a alta taxa de mutação dos genes mitocondriais.

Algumas enzimas de reparo do DNA reconhecem e reverte os danos produzidos no DNA: fotoliase e O⁶-metilguanina metiltransferase.

A radiação UV com um comprimento de onda de 260 nm é absorvida fortemente pelas bases do DNA, e pode promover uma fusão fotoquímica de bases pirimídicas adjacentes, formando ou dímeros de timina ou um fotoproduto “6-4” mutagênico (Figura 12.5).



O DNA de uma pele exposta ao sol pode adquirir centenas de dímeros por dia, que são normalmente reparados. Entretanto, existe uma doença de pele XERODERMA PIGMENTOSUM, que é causada por um

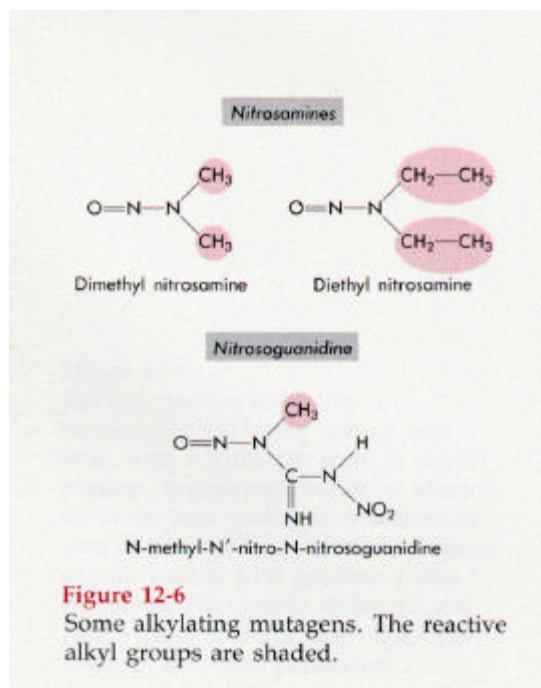
defeito genético na enzima que remove os dímeros. A luz UV do sol promove normalmente nessas pessoas, o aparecimento anormal de mortes celulares e aumento de câncer de pele.

No homem, esses dímeros são removidos pelo reparo por excisão e pela resposta SOS.

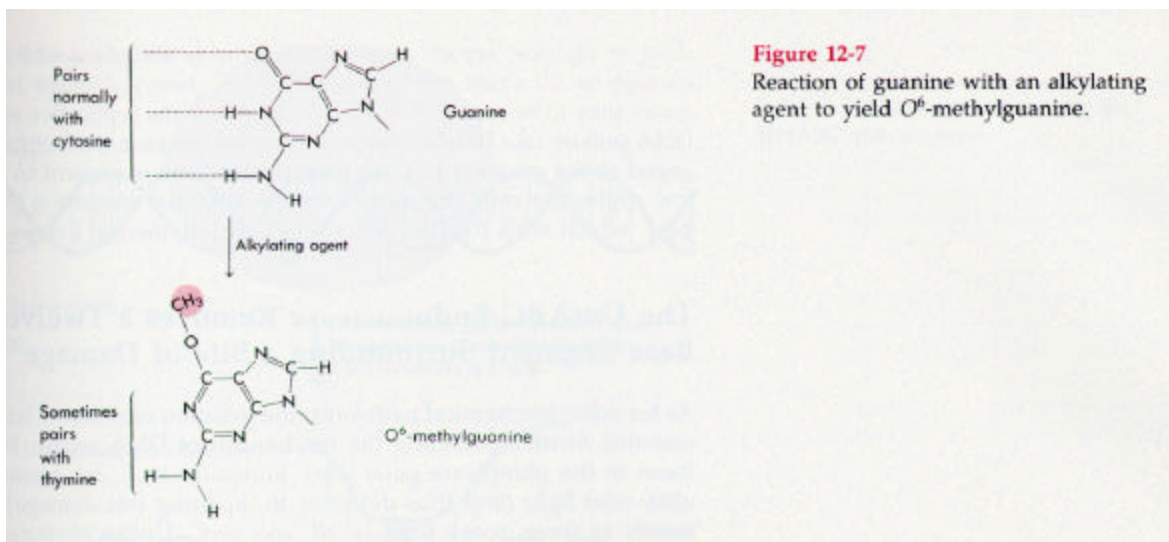
Os dímeros de pirimidina são alvos de uma enzima universal fotoliase, a qual se liga ao dímero e catalisa uma 2ª reação fotoquímica usando a luz visível, que muda o anel ciclobutano para bases pirimídicas normais. Esse processo é chamado de fotoreativação.

Um segundo tipo de dano resulta da ALQUILAÇÃO que é a transferência de grupos metil ou etil, que reagem com as bases do DNA, levando a uma alteração das bases e o conseqüente pareamento errado.

Entre os agentes alquilantes, se inclui as **nitrosaminas** e um potentíssimo agente mutagênico usado em laboratório, que é o **metil-nitrosoguanidina** (Figura 12.6).



Um dos mais vulneráveis sítios de alquilação é a base guanina, que é particularmente sujeita a metilação do oxigênio-6 do átomo de carbono (Figura 12.7).



O produto O^6 -metilguanina normalmente se pareia erradamente com a TIMINA, mudando o par de base GC – TA quando o DNA é replicado.

Esta lesão é removida pela enzima celular: O^6 -metilguanina-metiltransferase, codificada pelo gene *ada*, que reconhece O^6 -metilguanina do DNA fita dupla e remove o grupo metil, transferindo-o para um AA da enzima, possivelmente para a cisteína.

Essa mesma enzima possivelmente também remova os grupos metil, que estão ligados aos grupos fosfatos da cadeia de DNA. Uma bizarra e extravagante característica dessa reação, é que não existem meios de se recuperar a **enzima metilada**. Desta forma, uma nova molécula de enzima é gasta para cada grupo metil removido.

Resposta Adaptativa.

Se durante o crescimento da *E. coli* elas forem expostas a uma baixa concentração de nitrosoguanidina, elas se tornam, posteriormente, muito mais resistentes aos efeitos tóxicos e mutagênicos desse agente.

Esta indução de resistência é chamada RESPOSTA ADAPTATIVA, e resulta de um aumento de centena de vezes da enzima O^6 -metilguanina-metiltransferase e uma concorrente indução de glicosilase, que remove bases alquiladas do DNA.

A indução de ambas as enzimas são bloqueadas por mutações no gene *ada*.

A MAIORIA DOS REPAROS DEPENDE DA INFORMAÇÃO CONTIDA NA FITA COMPLEMENTAR DO DNA.

É a própria natureza da molécula, fita dupla de DNA que permite quase sempre que um erro seja reparado; pela possibilidade de se restabelecer a seqüência original de uma cadeia, usando como molde a fita complementar.

Existem vários caminhos para que o reparo por excisão atue removendo a base ou segmento de DNA. Todos eles levam, entretanto, ao mesmo produto intermediário: uma quebra na fita simples ou um gap no DNA que proporciona o aparecimento de uma 3' hidroxila terminal, onde a polimerase pode iniciar a síntese de uma nova seqüência.

Células mutantes para o gene da DNA polimerase I são muito deficientes para realizarem o reparo por excisão.

Somente esta enzima é abundante e suficientemente móvel para localizar pequenas falhas (gaps), eficientemente, quando muitos sítios devem ser reparados de uma só vez.

Outra enzima comum e essencial no processo é a DNA ligase (polinucleotídeo ligase) que liga os nucleotídeos após a correção feita pela DNA polimerase I.

A ENDONUCLEASE UvrABC REMOVE UM SEGMENTO DE 12 PARES DE BASES AO REDOR DO SÍTIO ALTERADO.

O isolamento de mutantes tem sido essencial para a compreensão dos mecanismos de reparo do DNA.

Além do gene (*phr*) da fotoliase, as mutações em *E. coli* que as tornam sensíveis a luz UV podem ocorrer, principalmente, em 3 genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*.

Diferentemente do processo de fotoreativação, o sistema de reparo exercido por estes 3 genes não é específico para danos provocados exclusivamente pela UV, mas por quaisquer alterações que envolvam alterações e distorções espaciais na molécula de DNA.

Esses 3 genes codificam separadamente subunidades de uma mesma enzima que corta e remove o segmento de uma fita de DNA que apresenta a alteração.

Estudos de clonagem dos 3 genes *uvr* permitiram a obtenção de grande quantidade de produtos polipeptídicos desses genes e a sua purificação separadamente.

Quando eles foram misturados *in vitro* com DNA contendo dímeros de pirimidina, constatou-se uma complexa atividade dependente de todos os 3 genes: A enzima **UvrABC** corta em ambos os lados do dímero, liberando um oligonucleotídeo de 12 bases contendo o dímero e deixando um gap de 12 bases que é restaurado pela DNA polimerase, usando a fita normal como complementar.

A polinucleotídeo ligase ou DNA ligase completa a ligação lateral dos nucleotídeos, restabelecendo a informação correta novamente.

Ficou claro dos trabalhos experimentais desta enzima com DNA apresentando diferentes tipos de lesões, que a enzima UvrABC não detecta diretamente uma lesão em particular, mas realmente ela reconhece a AUSÊNCIA de uma forma normal no DNA.

Como isto ocorre?

Foi observado que os dois cortes são feitos no mesmo lado de uma das fitas do DNA, distando um pouco mais de uma volta. Normalmente ficam 7–8 nucleotídeos do lado 5' do dímero, e 4–5 nucleotídeos do lado 3' do dímero.

Imaginou-se que a enzima “sente” a forma do DNA no segmento de 12 pares, pelo alinhamento correto do centro de atividade nucleásica da enzima, possivelmente envolvendo a dupla fita.

Se a enzima detecta uma forma espacial anormal num dos fios, a sua atividade nucleásica é ativada e os cortes de restauração são feitos (Figura 12.8).

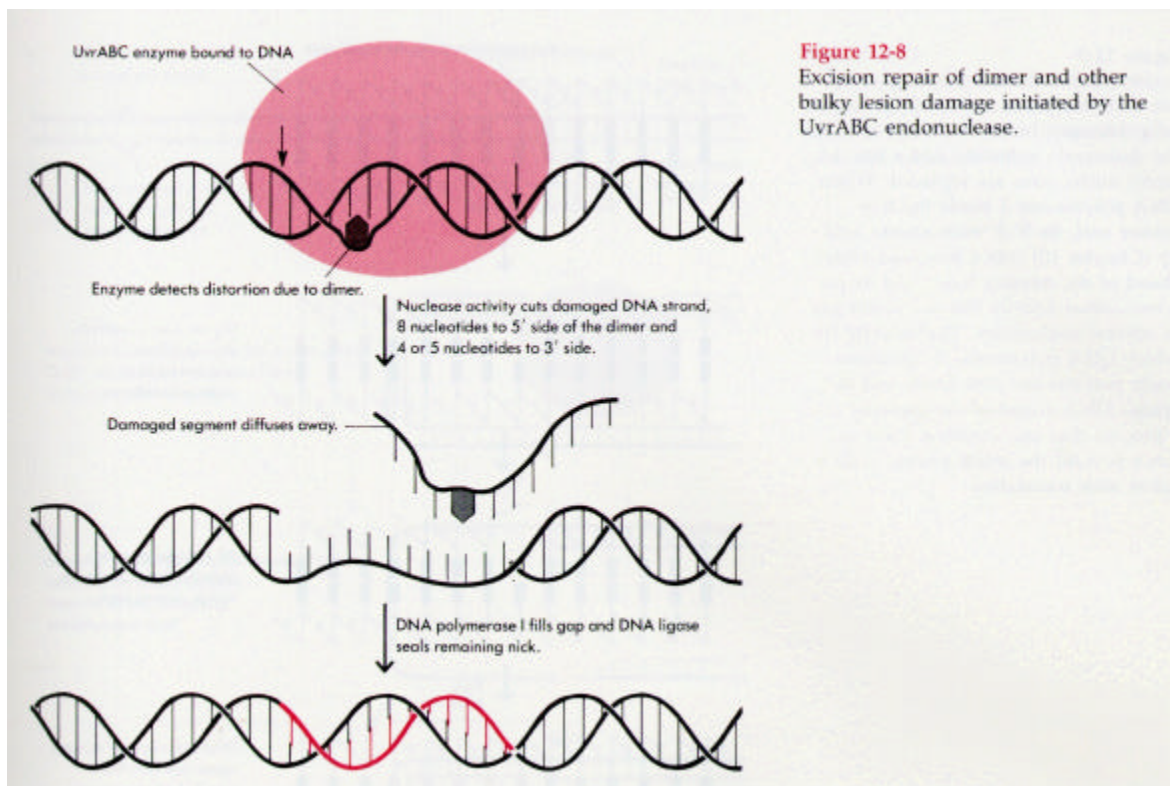


Figure 12-8
Excision repair of dimer and other bulky lesion damage initiated by the UvrABC endonuclease.

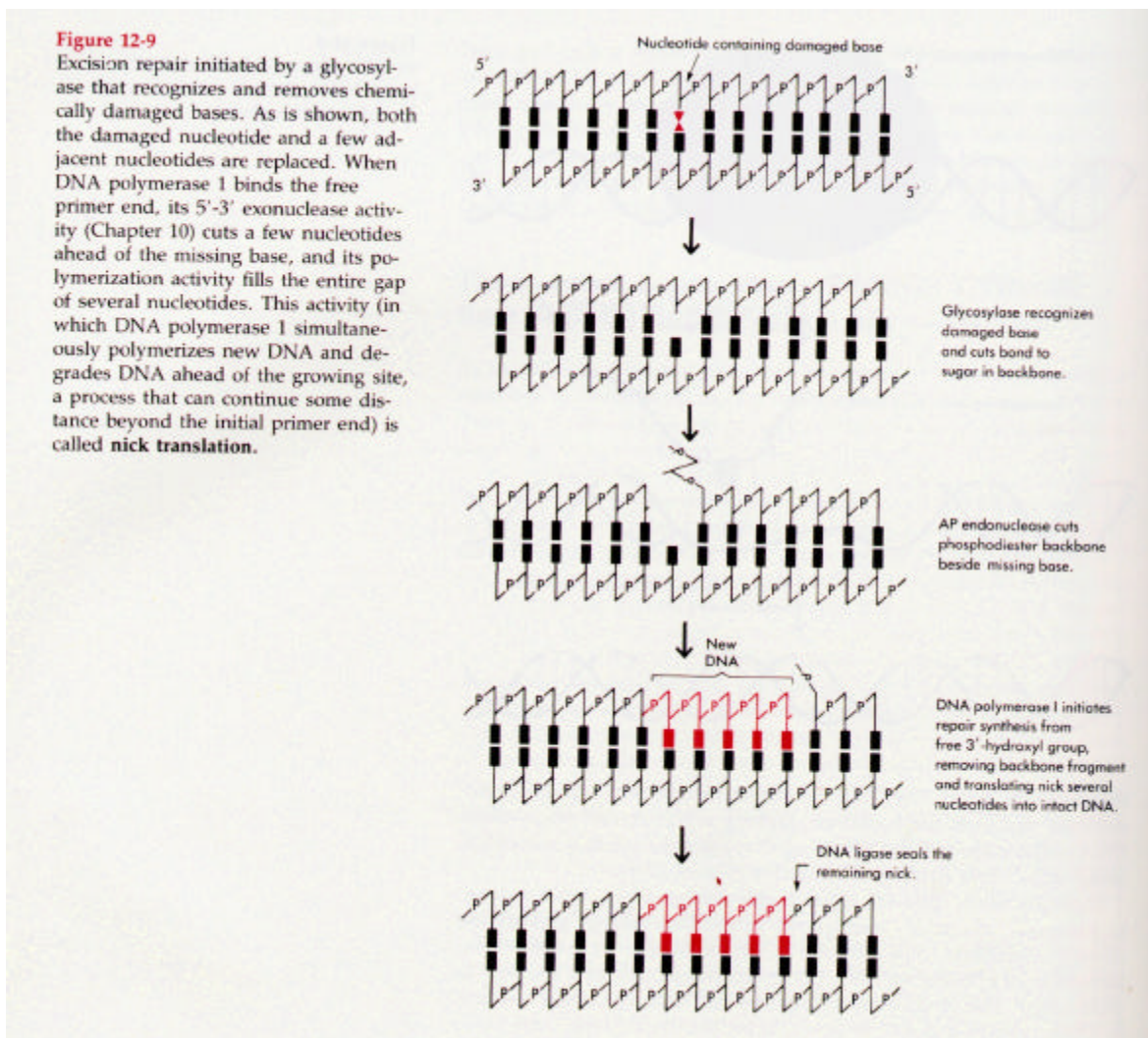
ERROS NAS BASES PODEM SER REMOVIDOS PELAS GLICOSILASES.

As células tem uma segunda maneira de retirar ou excisar a base alterada e este processo se inicia por uma enzima **GLICOSILASE**, que detecta uma base alterada e a remove do açúcar dextribose, deixando intacta a estrutura helicoidal **açúcar-fosfato**.

O "buraco" (falha) resultante dessa remoção de base é chamado **sítio AP**, que é uma abreviação de sítio APURINICO quando faltam as bases A ou G, ou de sítio APIRIMIDICO, quando faltam as bases C ou T.

Esses sítios também podem resultar de perdas naturais de bases através de rupturas das ligações glicosídicas.

O "buraco" é, então, reconhecido por uma **endonuclease AP** que corta o esqueleto açúcar-fosfato (ligação fosfodiéster) deixando um primer final, de onde a DNA polimerase inicia a síntese para substituir o nucleotídeo errado, junto com alguns poucos nucleotídeos adjacentes (Figura 12.9).



Quando a DNA polimerase I se liga ao primer final, a sua atividade exonuclease 5'-3' atua cortando (retirando) uns poucos nucleotídeos perto da base errada, e sua atividade polimerásica se incumbem de completar o gap formado.

Essa atividade, na qual a DNA polimerase I simultaneamente realiza a remoção dos nucleotídeos e faz a correta polimerização, é chamado de NICK TRANSLATION.

Existem diferentes glicosilases que removem lesões específicas, em particular, as bases aberrantemente metiladas.

A URACILA-DNA GLICOSILASE corrige um problema causado pela instabilidade natural da citosina.

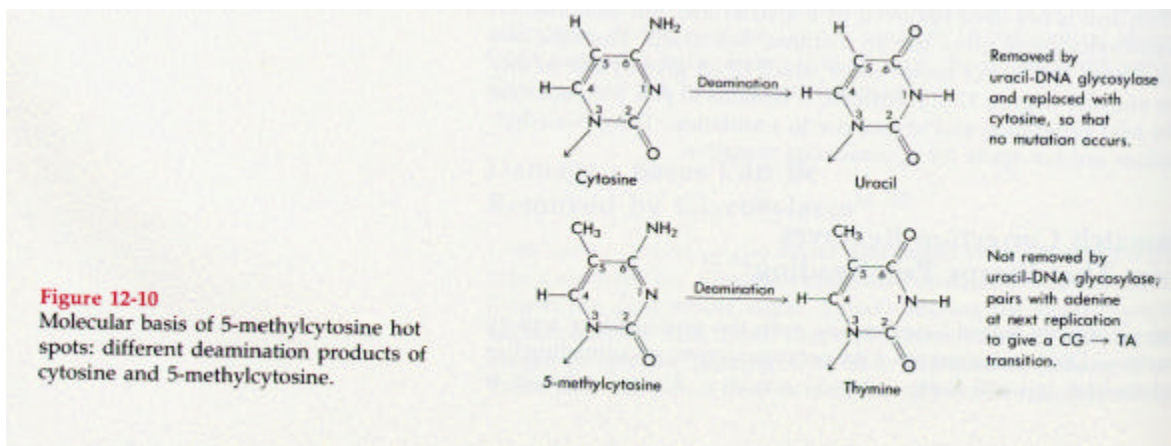
A deaminação da citosina ocorre espontaneamente em uma baixa taxa, produzindo uracila.

A glicosilase reconhece e remove os resíduos de uracila do DNA, permitindo que a citosina seja restabelecida pela DNA polimerase.

Este sistema de reparo é frustrado de uma maneira eficiente se a citosina é metilada no carbono-5, como ocorre, por exemplo, em seqüências protegidas de endonucleases de restrição.

A 5-metil citosina se parecia normalmente no DNA e não é removida pela glicosilase, entretanto, a **deaminação** da 5-metil citosina resulta em TIMINA e não em URACILA.

A timina, sendo uma base natural do DNA, não é removida pela URACILA-DNA GLICOSILASE ou por outra enzima qualquer (Figura 12.10).



Essa timina, produzida a partir da 5-metil citosina, irá se parear com a adenina, aumentando a taxa de mutação. Desta forma, a 5-metil citosina é considerada como “hot-spot” para mutações espontâneas.

REMOÇÕES DE ERROS DE PAREAMENTOS QUE ESCAPARAM DA “REVISÃO”.

Alguns pareamentos errados de bases se mantêm mesmo após a atividade revisora exercida pela DNA polimerase, em bactérias.

Assim como na polimerização, a revisão dos erros pode ter um limite finito de eficiência.

Uma boa estimativa é que a DNA polimerase cometa um erro por 10^8 pares de bases replicados que, entretanto, não se manifestam como mutações, visto que a taxa de mutação é mais baixa e equivale a ± 1 erro para cada $10^{10} - 10^{11}$ nucleotídeos.

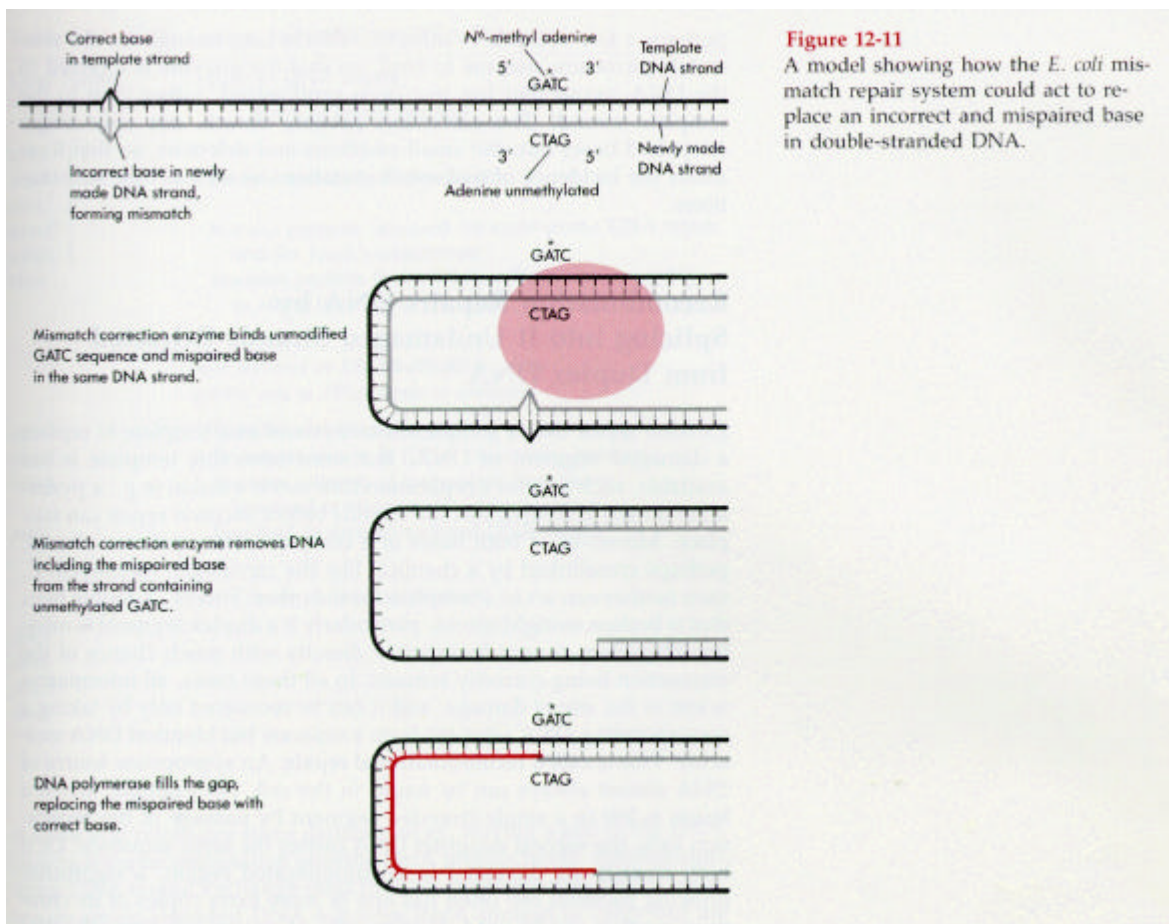
Em *E. coli*, o grau final de fidelidade é de responsabilidade de uma **mismatch correction enzyme** codificada pelos genes: mutH, mutL e mutS.

Esta enzima checka o DNA recentemente replicado para detectar o pareamento impróprio e remove um segmento fita simples do DNA contendo o nucleotídeo errado, permitindo a posterior ação da DNA polimerase para refazer o gap.

O problema óbvio é de como a enzima detecta qual BASE de um par impróprio é a ERRADA, visto que ambas são componentes naturais do DNA. Se qualquer uma das bases for removida ao acaso, é claro que existe uma probabilidade de 50% ser removida a base certa (estabelecendo a mutação) e 50% de ser removida a base errada, e o DNA ser corrigido.

Realmente, um sinal específico atua para que o sistema de excisão da base errada aconteça somente no filamento que foi recentemente sintetizado.

A “enzima de correção de pareamento” remove um segmento de DNA que contém a base errada somente de uma cadeia, onde também ocorre uma sequência **GATC** próxima (Figura 12.11).



Entretanto, se a metilase codificada pelo gene *dam* modificar primeiro a adenina na seqüência GATC transformando-a para N⁶-metiladenina, a enzima de correção não pode atuar e o reparo por excisão não ocorre.

A maioria das seqüências GATC se tornam, assim, modificadas após a sua síntese, mas somente após um curto período, talvez por segundos ou minutos. Este tempo é suficiente para a “enzima de correção de pareamento” se ligar nessa seqüência GATC da cadeia que foi recentemente sintetizada.

A enzima de correção detecta não somente erros de pareamento como também pequenas adições ou deleções, reduzindo a ocorrência de frameshift mutation, bem como a substituição de bases.

INDUÇÃO DOS GENES SOS DE REPARO DE DNA.

Visto que a célula pode freqüentemente regular a expressão de seus genes de acordo com a necessidade de seus produtos, não é surpreendente que algumas enzimas de reparo possam ser induzidas pelos danos provocados no DNA.

Por exemplo: As metiltransferases são induzidas pelo DNA anormalmente alquilado durante a resposta adaptativa. Entretanto, um grupo maior e mais importante de enzimas são codificadas pelos genes SOS.

Os genes SOS são induzidos por um erro que é suficientemente severo para bloquear a síntese de DNA, mais do que simplesmente alterar uma mudança nos pareamentos das bases.

Um exemplo de indução da resposta SOS é provocado pela ocorrência dos dímeros de pirimidina, que não alteram o par de base.

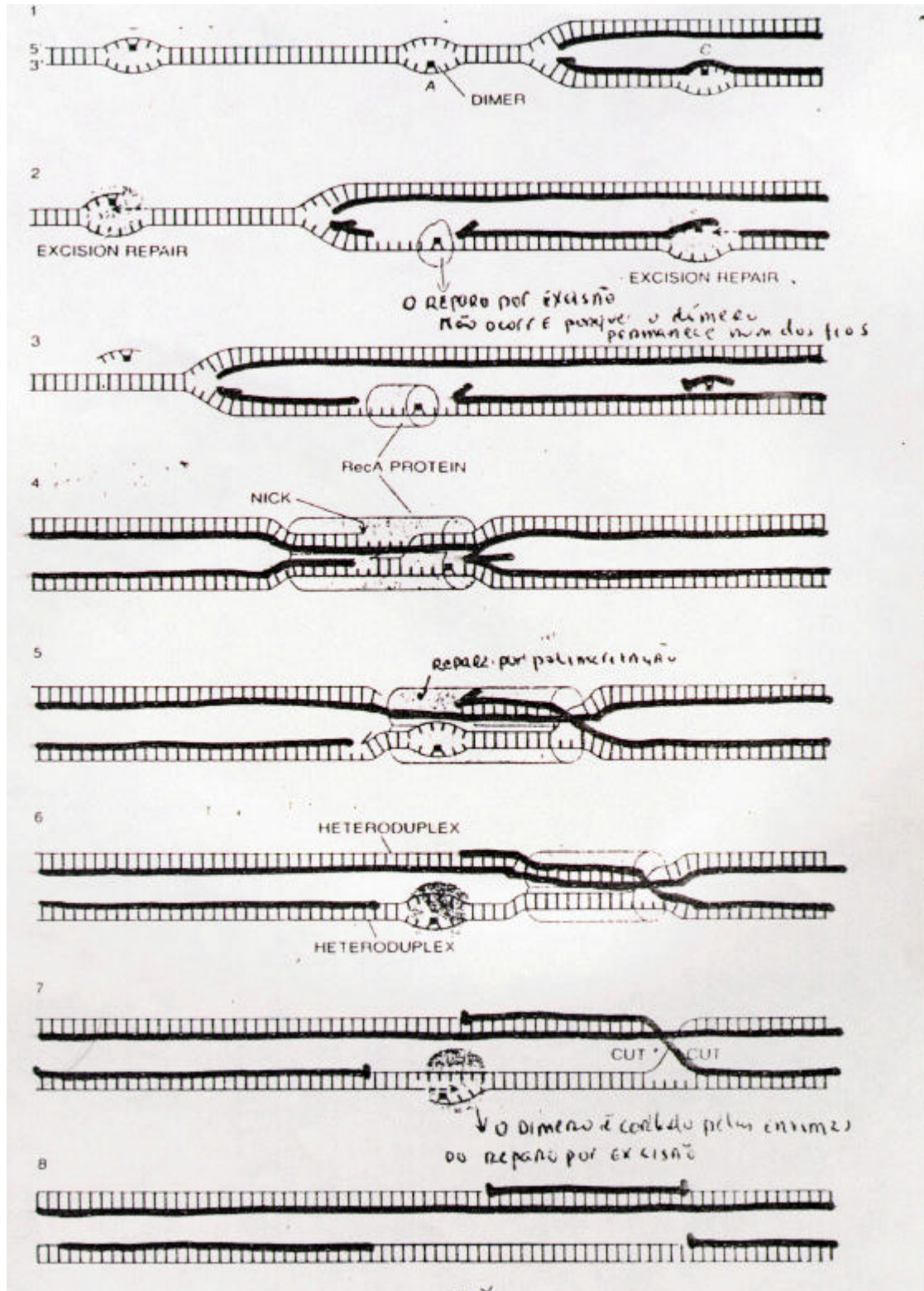
Quando a forquilha de replicação encontra o dímero, ela para e reinicia a síntese em um ponto distante do dímero, produzindo um gap no DNA que irá ser reconhecido pela enzima de recombinação *recA*, que se ligará nessa região.

Além de iniciar a troca de cadeias de DNA, assim como no reparo recombinacional, a ligação da enzima recA a um pedaço de fita simples do DNA, faz com que ela assuma uma outra função inteiramente distinta da recombinação e passe a ter uma atividade proteolítica.

Essa atividade proteolítica faz com que ela seja capaz de clivar os repressores dos genes da resposta SOS, produzidos pelo gene repressor LexA.

Desta forma, a proteína RecA promove tanto o reparo por recombinação, como é mediadora da indução de aproximadamente 15 genes SOS.

Alguns desses genes que estão relacionados com os reparos por excisão como *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* e o próprio *recA*, aparecem normalmente expressos numa taxa significativa mesmo sem a indução; entretanto, eles são muito mais rapidamente expressos quando ocorre a lesão do DNA. (Figura 2)



(Figura 2) POSTREPLICATION REPAIR deals with a pyrimidine dimer (A) that interferes with replication, during which the parental strands (black) unwind at the replication fork and two daughter strands (color) are synthesized (1); other dimers (B, C) are handled by excision repair. Dimer A prevents base pairing along a stretch of one parental strand, producing a postreplication gap opposite a stretch of single-strand DNA (2). Rec A protein (light color) binds of the single-strand region (3) and aligns it with a mologous region of the sister duplex; when homologous pairing is achieved, an enzyme into the gap, producing a crossed-strand exchange (5). The upper heteroduplex can now be repaired by DNA polymerase. With the correct sequence in place opposite dimer A an with Rec A released, dimer A is delatl with by excision-repair enzymes (6). Finally, two cuts are made by an enzyme at the site of the crossed-strand exchange (7), resolving the recombination process and producing two intact heterodunplex molecules (8).

FENÔMENOS *rec-lex*.

Com diplóides parciais em *E. coli* que apresentavam duas versões de um mesmo gene, foi observado que *lexA*⁻ era dominante sobre *lexA* (selvagem) e que a célula apresentava característica de *lexA*⁻ como, por exemplo, a sensibilidade aos efeitos das radiações X.

A dominância de um gene mutante freqüentemente indica que ele pode estar relacionado com a regulação gênica, como ocorre, por exemplo, com alguns mutantes do gene *lacI*, do operon lactose em *E. coli*.

Por analogia, imaginou-se que o *lexA* poderia codificar uma proteína repressora que regulasse certas enzimas envolvidas no reparo do DNA.

Os mutantes *lexA*⁻ podiam ser sensíveis a UV, porque eles fariam moléculas repressoras que não seriam clivadas e manteriam os genes responsáveis pelo reparo, totalmente bloqueados.

Os trabalhos subsequentes mostraram que as enzimas de reparo e do sistema SOS são controladas ao mesmo tempo.

Através de técnicas do DNA recombinante, foi possível se isolar o gene *lexA*, inseri-lo num plasmídeo, cloná-lo e identificar uma proteína feita por ele que tinha um PM: 24.000 dáltons.

Ela foi isolada e verificaram que essa proteína repressora podia ser clivada pela protease do gene *recA*.

Mark Ptashne & Roger Brent demonstraram que o gene *lexA* é reprimido pela própria proteína *LexA*, que ele fabrica.

Se o *lexA* é um gene repressor, quais genes ele reprime além dos seus?

Verificaram que *lexA* atua reprimindo um grupo de genes envolvidos no reparo por excisão, reparo pós-replicação e na própria resposta SOS.

Quando as células são expostas a UV, ocorre a formação dos dímeros de pirimidinas, que não podendo ser removidos por algumas poucas moléculas presentes no estado não induzido, vão permanecer perto da forquilha de replicação e vão ocasionar o aparecimento de fitas de DNA com gaps.

Uma proteína *RecA* já presente na célula se liga ao fio de DNA fita simples oposto ao gap, e a presença do DNA fita simples estimula a atividade de clivagem das proteínas *RecA*, desencadeando a resposta SOS.

A proteína *RecA* cliva os repressores *LexA*, liberando outros genes que estavam reprimidos. Grande quantidade de proteína *RecA* são sintetizadas e passa a se ligar próximas a região do gap, inclusive ocupando regiões adjacentes de DNA fita dupla.

Sob estas condições, a proteína *LexA* é clivada tão logo ela é sintetizada e os genes *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* ficam liberados para promoverem os reparos: por excisão e pós-replicação.

Enquanto houver DNA fita simples na região do gap, a atividade protease da *RecA* é mantida e vai clivando continuamente os repressores formados pelo gene *lexA*.

Após ser executado o reparo pós-replicação, a região do gap de fita simples é restaurada e agora, nessas condições com todo o DNA na forma de fita dupla, a proteína *RecA* diminui sua atividade protease.

A proteína *LexA*, recém-sintetizada, não é mais clivada e volta a funcionar como repressora, e a célula retorna ao seu estado normal sem resposta SOS induzida.

Claramente, a resposta SOS promove um eficiente reparo do DNA, aumentando a eficiência das enzimas do reparo por excisão e promovendo condições para o reparo pós-replicação.

No reparo por excisão, as enzimas codificadas pelos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC* atuam juntas para reconhecer as bases “erradas” e iniciam o processo de excisão.

Visto que as células podem sobreviver após a ocorrência de milhares de lesões, é necessário que um grande número dessas moléculas sejam sintetizadas para atuar no processo.

Em uma célula normal, sem estar no estado induzido, ocorrem de 10-20 moléculas dessas enzimas.

A proteína *RecA* tem duas diferentes funções nesses mecanismos de reparos induzidos: atua como protease clivando as proteínas repressoras *LexA*, e atua como enzima de recombinação que manipula os fios de DNA.

Na recombinação, tal como ocorre no reparo pós-replicação, a sua primeira função é a de promover o pareamento homólogo entre 2 moléculas de DNA, isto é, posicionar corretamente alinhando regiões de seqüências de bases complementares, para que se efetue uma mudança de fios.

Uma grande quantidade da proteína *RecA*, 1 molécula para cada 5 pares de bases é necessária para promover o pareamento homólogo, e ser suficiente para dar ao fio com o gap uma estrutura fibrosa de suporte, que aproxima as moléculas de DNA, pondo-as em contacto e movendo-se para que seja feito um contacto complementar.

O movimento relativo é no estilo caterpillar, o DNA com gap se alonga e se contrai com a RecA ligada a ele, que depois é liberada pelo ATP.

Tendo colocado as moléculas de DNA no alinhamento numa região particular, a RecA inicia a efetiva mudança dos fios.

A recA efetua uma mudança recíproca nas duas regiões de dupla fita do DNA e o resultado são 2 heteroduplex, nos quais os 4 fios apresentam segmentos com as informações corretas. (Figura 3)

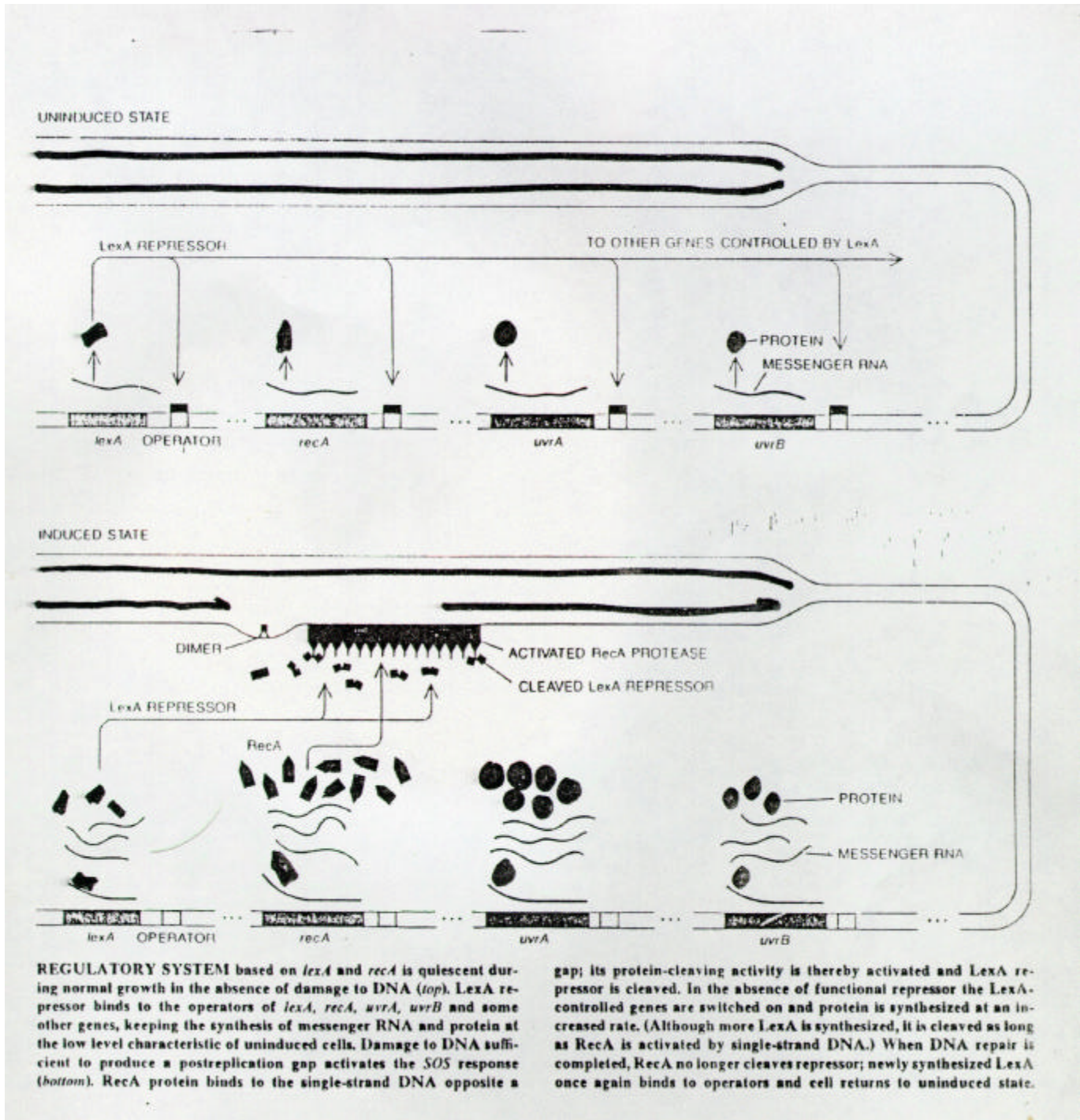


Figura 3

MUTAGÊNICOS NA NATUREZA E SUA DETECÇÃO.

É importante identificar mutagênicos aos quais o homem se expõe por duas razões:

1. As mudanças genéticas ocorridas ao acaso são mais prováveis de serem danosas (maléficas), do que benéficas para as próximas gerações.
2. Mesmo que as mutações ocorram nas células somáticas (linhagens não germinativas) e não passem para as gerações seguintes, elas podem eventualmente afetar o organismo portador.

Agora já se sabe como há muito se suspeitou, que o câncer é freqüentemente resultado de mutações nas células somáticas que levam a um crescimento celular desordenado. E um número de alterações associadas com a idade, como a aterosclerose, pode ser o reflexo do acúmulo de erros de DNA que não foram reparados.

De fato, tem sido sugerido que o processo de envelhecimento global possa ser o reflexo de danos irreversíveis da molécula de DNA em células somáticas.

A clara demonstração que a maioria das substâncias mutagênicas são carcinogênicas (e vice-versa), significa que há uma maneira de se poder determinar se a substância é provavelmente carcinogênica.

Nós determinamos se ela é mutagênica em bactérias, as quais apresentam um tempo curto entre gerações e que permite que o teste possa ser feito em um ou dois dias (Figura 12.2).

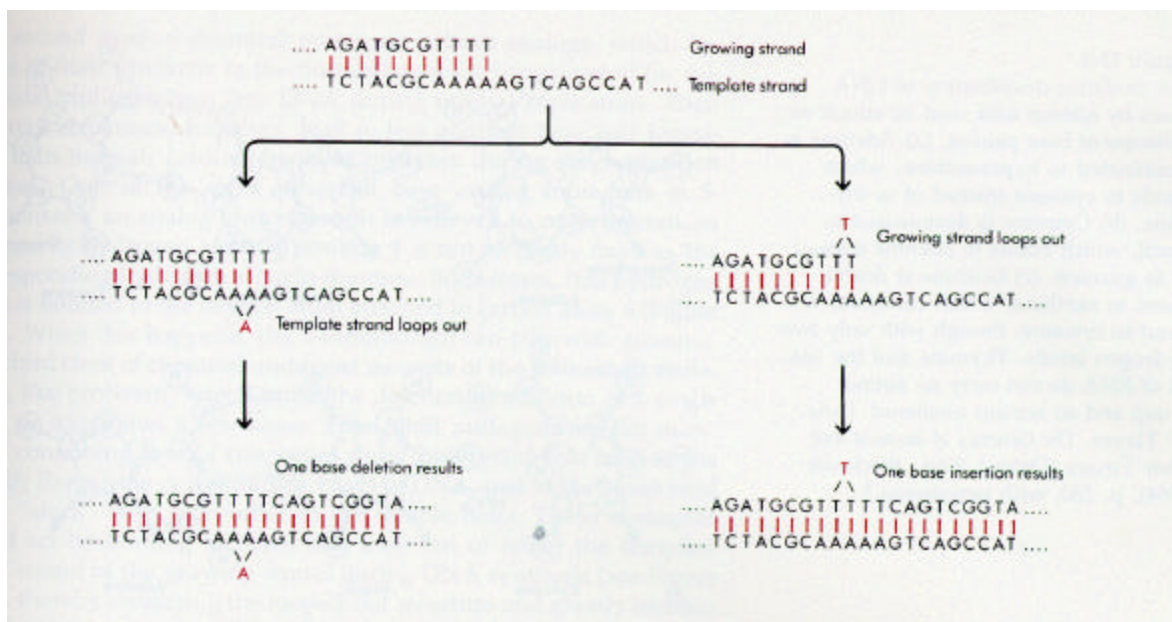
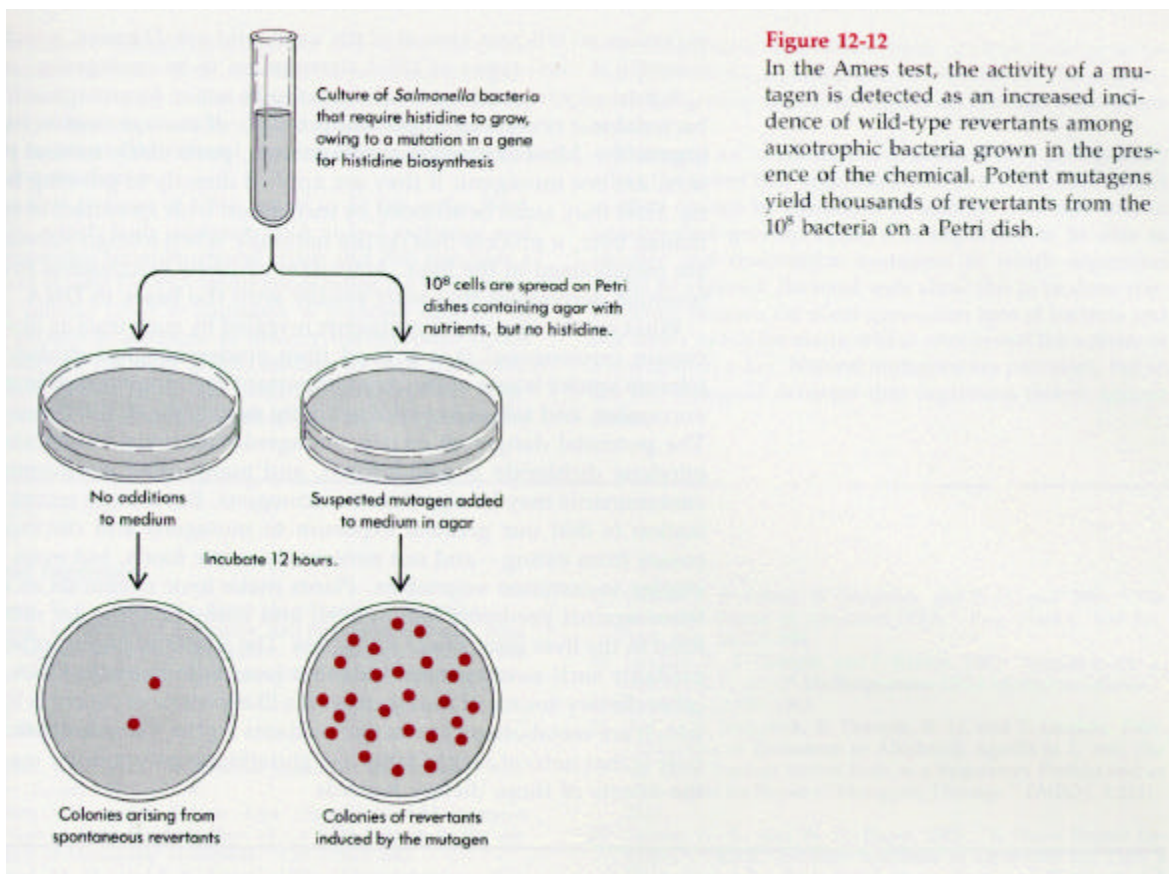


Figura 12-2

Small additions and deletions are caused by slippage at the replication growing point.

Este método, agora chamado de Teste de Ames, foi desenvolvido e refinado por Bruce Ames, o qual usou várias artimanhas para fazê-lo muito sensível.

A taxa de REVERSÃO ao tipo selvagem (prototrófico) de uma mutação que causa um crescimento anormal, tal como o requerimento (auxotrófica) para o aminoácido **histidina**, é quantificada. Mesmo entre aquelas poucas células que crescem em meio sem histidina, pode-se desenvolver colônias que podem ser quantificadas (revertentes espontâneos) (Figura 12.12).



O teste de bactéria tem revelado que a mutação faz com que a parede celular fique defeituosa e altere a sua permeabilidade, permitindo, assim, que a maioria dos compostos a serem testados passem por ela e atuem sobre o material genético.

Elas também carregam um plasmídeo que expressam uma eficiente variante dos genes *umuC* e *umuD*, os quais são essencialmente mutagênicos.

Uma condição final para carcinogênicos serem ativos como mutagênicos nos testes com bactérias, revelou um princípio importante da mutagênese em organismos superiores.

A maioria dos compostos carcinogênicos, particularmente os produtos naturais, eles não são mutagênicos se eles são aplicados diretamente no crescimento de bactérias. Primeiro, eles precisam ser ATIVADOS por incubação com um extrato de fígado de mamífero, um processo que ocorre naturalmente quando substâncias estranhas são metabolizadas no fígado.

A ativação converte os carcinogênicos para derivados eletrofílicos, que podem reagir diretamente com as bases do DNA.

Quais são os mais importantes mutagênicos revelados pelos testes como prováveis carcinogênicos?

Está provado, por meio de testes epidemiológicos, que a fumaça do tabaco é um dos mais importantes carcinógenos que os homens utilizam, e a fumaça do tabaco é altamente mutagênica para o teste de Ames.

O perigo potencial de certos resíduos químicos industriais serem mutagênicos, como o *dicloro etileno* é bem conhecido, e alguns outros contaminantes ambientais podem ser significantes carcinogênicos.

Mas a maior constatação recente, é que nós estamos expostos continuamente aos mutagênicos e aos carcinógenos que entram via alimentação; que não são necessariamente encontrados em comidas exóticas, mas nos mais simples vegetais.

As plantas recebem substâncias químicas, como os defensivos usados contra as pragas, principalmente insetos, e essas substâncias, após serem metabolizadas no fígado, se constituem em potentes agentes mutagênicos.

Os reais mutagênicos freqüentemente são OXIDANTES, tais como aqueles radicais oxigenados, que reagem como as bases do DNA.

Uma outra fonte de mutagênicos que entram via alimentação e são considerados como potenciais carcinógenos são os lipídios, que são metabolizados e produzem oxidantes reativos no fígado.

Uma nota otimista, entretanto, é que existem ANTIOXIDANTES naturais como o glutathione, que pode minimizar alguns desses efeitos produzidos pelos alimentos.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOBRE AS AULAS TEÓRICAS.

DNA MICROSATELLITES: Agents of Evolution

Scientific American, 1999, 280(1):72-77.

slide 1.



CÓDIGO GENÉTICO HUMANO: 3 bilhões de bases de DNA.

Apenas 10-15% estão relacionadas com PROTEÍNAS DE MANUTENÇÃO,

REGULAÇÃO GÊNICA E EMPACOTAMENTO DOS CROMOSSOMOS.

E O RESTO? "SUJEIRA EVOLUTIVA" ?

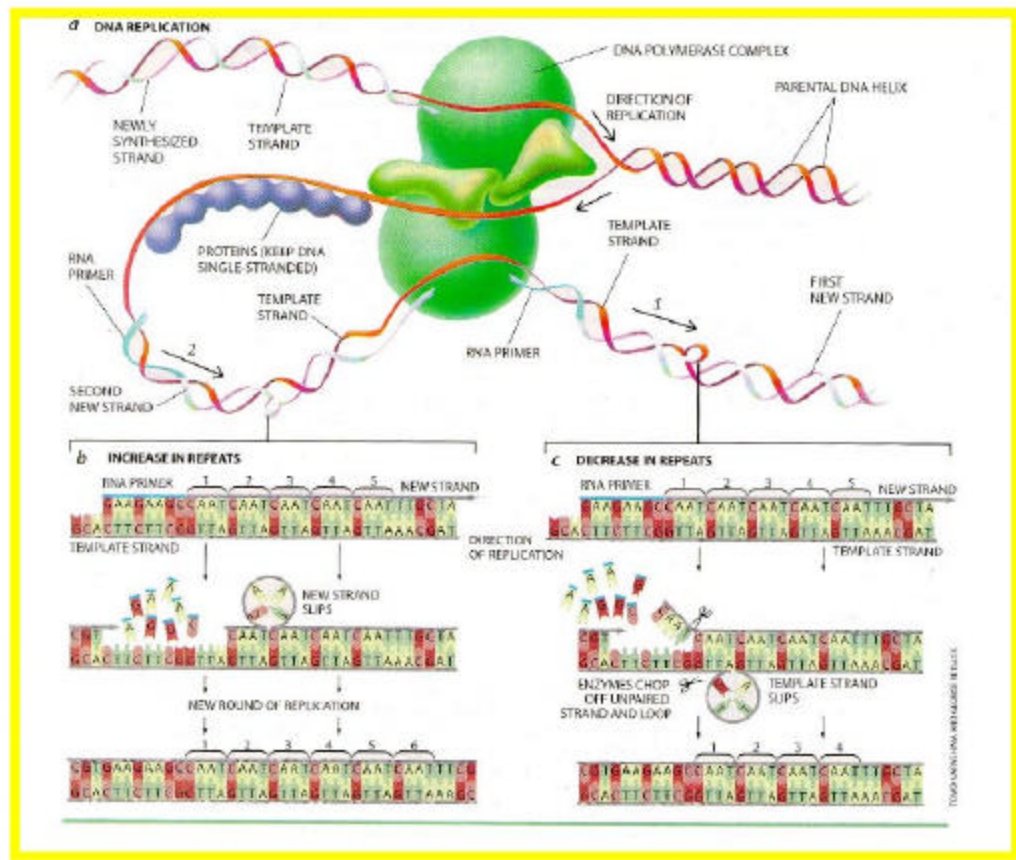
slide 2.

"SUJEIRA EVOLUTIVA" - seqüências altamente repetitivas

4- até 8 bases: MICROSSATÉLITES
15 ou mais bases: MINISSATÉLITES

HOMEM: 100.000 microssatélites

slide 3



Características dos microssatélites

- altamente repetitivo
- alterações de tamanho - DELEÇÃO E INSERÇÃO
- alta taxa de mutação: 10 mil X > que a taxa de mutação do gene da anemia falciforme.

slide 4

Hemophilus influenzae - LINHAGEM DO TIPO b -
RESPONSÁVEL PELA MENINGITE BACTERIANA

membrana externa: LIPOSSACARÍDEOS (LPS) -
CONTENDO

COLINA FOSTATADA - que permite a bactéria se aderir
em células do NARIZ E GARGANTA - sem provocar
sintomas.

Nota: 1/750 crianças menores de 5 anos tinham meningite do
tipo B.

slide 5.

A MEMBRANA EXTERNA (LPS) É CODIFICADA POR
TRÊS GENES - QUE APRESENTAM
MICROSSATÉLITES DE 4 BASES: CAAT.

Chop + alto número de repetições

Chop - pouco número de repetições

slide 6.

Chop + ==.> EFICIENTE PARA CONTAMINAR O
HOMEM (NARIZ - GARGANTA)
(TIPO MAIS FREQUENTE NO
HOMEM)

Chop - == > É MAIS RESISTENTE AOS ATAQUES
IMUNOLÓGICOS - NÃO SE ADERE
AS CÉLULAS.

slide 7

INFECÇÃO VIRAL - PROCESSO INFLAMATÓRIO
A BACTÉRIA IRÁ TER QUE SE DEFENDER AO
ATAQUE IMUNOLÓGICO E AÍ A SITUAÇÃO **Chop-**
SERÁ VANTAJOSA.

slide 8

GENES CONTINGENTES - pequena fração do genoma
bacteriano responsáveis por estas duas condições.
Se somente **10 dos 2000 genes** de uma bactéria forem
contingentes, ela poderá ter a cada divisão pelo menos um
dos tipos **Chop+** ou **Chop-**

slide 9

DOENÇA DE HUNTINGTON

DEGENERATIVA CARACTERIZADA POR DEMÊNCIA,
PERDA DO CONTROLE MOTOR E MORTE RÁPIDA
APÓS A SUA EXPRESSÃO.

MANIFESTAÇÃO OCORRE GERALMENTE APÓS A
IDADE REPRODUTIVA.

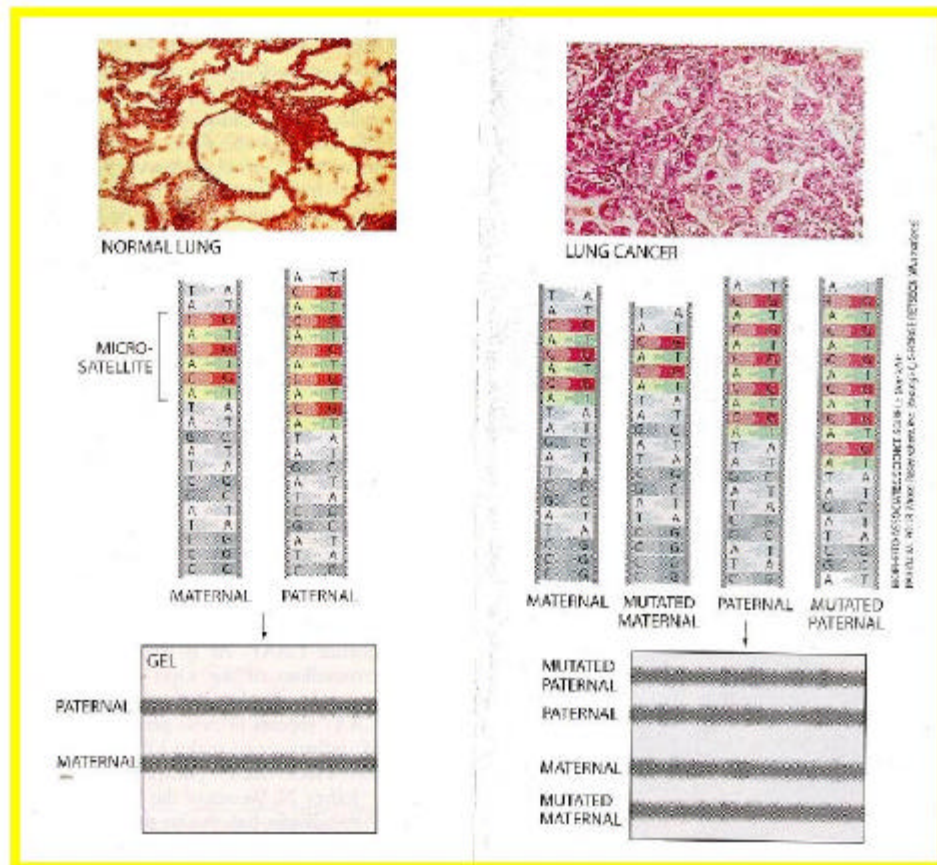
slide 10

DOENÇA DE HUNTINGTON - DOMINANTE

Alteração em uma proteína normal chamada **HUNTINGTIN** - que tem no seu início 10-30 GLUTAMINAS (Gln).
 Microssatélites - alteram a proteína colocando 36 - ou mais Gln na cadeia.

slide 11

DETECTANDO CÂNCER



MUTAÇÕES nos genes *p53* e *ras*
Pode-se detectar **1/10.000** células normais.

Mas não ocorrem em todos os tipos de cânceres e nem mesmo em cânceres do mesmo tipo.

Slide 12

AVANÇO NO DIAGNÓSTICO

PELA ALTERAÇÃO NO TAMANHO DOS
MICROSSATÉLITES PODE-SE DETECTAR 1/500
CÉLULAS NORMAIS.

Nota:

Microssatélites como base evolutiva.

Neisseria gonorrhoeae - é uma bactéria que causa gonorréia
- uma doença sexualmente transmissível (DST)

12 ou mais genes *Opas* (formam colônias opacas de Bactérias) estão relacionados com as proteínas da membrana
- que ajudam a bactéria aderir e invadir células epiteliais como as do trato respiratório e sistema imune.

Genes opas - apresentam microssatélites com 5 bases CTCTT - com alta frequência de alterações no número dessas repetições.

Produzem 1 alteração a cada 100-1000 células filhas.
Inserções ou deleções - alteram a informação genética, por mudança ou códons de leitura.

- Algumas deleções - alteram proteínas da bactéria que impedem que elas entrem nas células.
- Essas deleções podem ser revertidas na geração seguinte.
- Variações de fase - podem ser adaptativas e permitem ou não a possibilidade de entrar nas células e serem fagocitadas.

UNIDADES DE RADIAÇÃO

ROENTGEN = R

DOSE DE EXPOSIÇÃO QUE PROMOVE
NUM CM³ DE AR (0,001293 g) UM
TOTAL DE ÍONS = 1 STAT-C.

$$2,082 \cdot 10^9$$

rad = ROENTGEN ABSORVED DOSE - É A

QUANTIDADE DE ENERGIA ABSORVIDA POR
UNIDADE DE MASSA DO MATERIAL IRRADIADO.

rad= 100 erg/grama RELAÇÃO = rad=0,877 R

GRAY = Gy - Dose Absorvida 1Gy= 100rad

RADIAÇÃO DIRETAMENTE PROPORCIONAL AO TEMPO E INVERSAMENTE PROPORCIONAL AO QUADRADO DA DISTÂNCIA.

$$\frac{(D1)^2}{(D2)^2} = \frac{R2}{R1}$$

D = DISTÂNCIA

R= ROENTGEN

FONTE DE CO-60 DA GENÉTICA

Nível de Radiação: 2220 R/hora/10 cm

Calcular qual a quantidade de radiação recebida por um cromossomo de linfócito humano depois de 20 min, considerando que o sangue foi irradiado dentro de um tubo, posicionado a 50 cm da fonte.

SUNLIGHT AND SKIN CANCER

David J. Leffel and Douglas E. Brash
Scientific American, July 1996, 38-43.

CÂNCER DE PELE: células basais, células escamosas e melanócitos - **MELANOMA MALÍGNIO** (menos comum)

USA - 38.000 casos em 1995 e apenas 7 000 mortes.

Danos no **gene p53** parece ser crucial aos cânceres de células basais e células escamosas que também estão associados a radiação UV-B do sol.

O GENE P53 - QUE É UM GENE SUPRESSOR DE TUMOR E QUE ESTÁ MUTADO EM MAIS DA METADE DAS PESSOAS QUE TEM CÂNCER.

CONSTATOU-SE UMA INTRIGANTE CONEXÃO ENTRE CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA (DE CÉLULAS BASAIS OU ESCAMOSAS) COM UMA RARA ALTERAÇÃO:

EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORMIS

QUE CAUSA O APARECIMENTO E CRESCIMENTO DE VERRUGAS NA PELE E QUE ELAS APRESENTAVAM DNA DO **VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO** - E QUANDO ESSAS VERRUGAS ESTÃO EXPOSTAS AO SOL, PODEM EVOLUIR PARA UM CÂNCER DE CÉLULAS BASAIS OU DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

FOI DEMONSTRADO POSTERIORMENTE QUE UMA DAS PROTEÍNAS FEITAS PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO **INATIVA A PROTEÍNA p53.**

ESTUDANDO CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS, QUE SÃO INEGAVELMENTE ASSOCIADOS AO SOL - POIS ACONTECEM NAS FACES E NAS MÃOS DE PESSOAS BRANCAS NOS TRÓPICOS - DESCOBRIU-SE QUE 90% DELES TINHAM UMA MUTAÇÃO EM ALGUM PONTO DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR P53.

HAVIA A OCORRÊNCIA DE **9 HOT SPOTS** EM SÍTIOS ADJACENTES AOS DÍMEROS DE BASES PIRIMÍDICAS, NOTAMENTE DO TIPO C-C, QUE LEVA A MUTAÇÃO DE PONTO C-T, TÍPICAS DE EXPOSIÇÃO A UV.

COMO TUDO ISTO ACONTECE?

p53 NORMAL E APOPTOSE (MORTE CELULAR PROGRAMADA)- EM CÉLULAS INJURIADAS PELO SOL.- SEGUIDAS DE SUBSTITUIÇÃO.

p53 MUTADO.

RETARDA O MECANISMO DE REPARO DE CÉLULAS DIMERIZADAS E COM MUTAÇÕES. **IMPEDE** QUE ELAS SE DESTRUAM E PERMITE A MULTIPLICAÇÃO DESSAS CÉLULAS MUTADAS QUE IRÃO OCUPAR OS ESPAÇOS DEIXADOS PELAS CÉLULAS NORMAIS INJURIADAS QUE MORRERAM. - LEVANDO A UM CRESCIMENTO DESORDENADO E APARECIMENTO DO TUMOR.

A LUZ DO SOL ATUA DUAS VEZES PARA CAUSAR O CÂNCER:

UMA PARA MUTAR O GENE P53 E OUTRA PARA INJURIAR

AS CÉLULAS SADIAS PRÓXIMAS DE CÉLULA MUTADA -

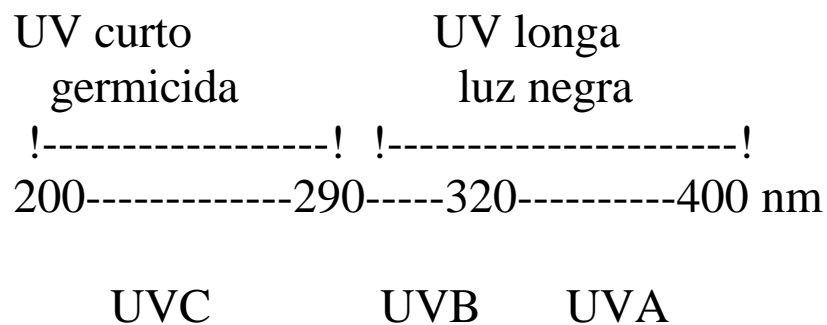
LEVANDO A SUA MORTE E CONSEQUENTE

SUBSTITUIÇÃO POR CÉLULAS COM O P53 MUTADO.

RISCOS DE UM BRONZEAMENTO RÁPIDO - CIÊNCIA HOJE, 1989 - 9(54):26.

CARMEN BOTO QUEROL & JOÃO ANTÔNIO PÊGAS HENRIQUES.

CLASSIFICAÇÃO:



UVA - luz negra - usada na PUVA terapia.

PUVA -terapia - consiste na associação de UVA longa + PSORALENOS

PSORALENOS OU FUROCUMARINAS - CONSTITUEM UM GRUPO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS TRICÍCLICOS DE ORIGEM NATURAL OU SINTÉTICA..

EM COMBINAÇÃO COM O DNA PROPORCIONAM EFEITOS BIOLÓGICOS DIVERSOS:

- SENSIBILIZAÇÃO DA PELE
- ATIVAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA
- INATIVAÇÃO CELULAR

- GENOTOXICIDADE - ALTERAM O CONTEÚDO INFORMACIONAL DOS GENES.

A PUVA TERAPIA É UTILIZADA PARA O TRATAMENTO:

PSORÍASE - APARECIMENTO DE PLACAS ÁSPERAS SALIENTES E FREQUENTEMENTE AVERMELHADAS, PRINCIPALMENTE NOS COTOVELOS E JOELHOS.

VITILÍGO - DESPIGMENTAÇÃO DE ÁREAS DA PELE PELA AUSÊNCIA DE MELANINA.

PSORÍASE:

TRATAMENTO CONSISTE EM TOMAR 2 CÁPSULAS DE PSORALENOS E VOLTAR À CLÍNICA DEPOIS DE 2 HORAS PARA UM BANHO DE RADIAÇÃO UV LONGA

APÓS 20 SESSÕES PELA INIBIÇÃO DA DIVISÃO CELULAR, COMEÇA-SE A VERIFICAR OS EFEITOS DA PUVA-TERAPIA..

NECESSITA - TERAPIA DE MANUTENÇÃO, COM CONSTANTES DESLOCAMENTOS E POSSIBILIDADES DE EXPOR O PACIENTE AO SOL, AUMENTANDO OS RISCOS DE ERITEMA, QUEIMADURAS E LESÕES NOS OLHOS.

USO CONTINUADO É QUESTIONADO:

- EFEITO CARCINOGENICO
- ENVELHECIMENTO PRECOCE
- TENDÊNCIA A APARECIMENTO DE CATARATAS.

VITILÍGO: REMÉDIO VITICROMIN - CONTENDO BERGAPTENO UMA FUROCUMARINA DE AÇÃO FOTOSSEMBILIZANTE - EMPREGADA NO TRATAMENTO DA DESPIGMENTAÇÃO - E QUE PODE LEVAR AO APARECIMENTO DE CÂNCER - DEPOIS DE 14-20 ANOS DE TRATAMENTO.

TRISORALEM - PSORALENO ENCONTRADO NO LIMÃO, LIMA, BERGAMOTA

OXARELEM OU 8-METOXIPSORALENO (8-MOP) - SUBSTÂNCIAS QUE REAGE A LUZ UV, PROVOCANDO, VÁRIOS EFEITOS INCLUSIVE O ESCURECIMENTO DA PELE.

CLÍNICAS ESTÉTICAS - PASSARAM A FAZER O BRONZEAMENTO RÁPIDO - USANDO A UV + PSORALENO.

CONTRA OS EFEITOS DA UV - SÃO USADOS FILTROS SOLARES OU PROTETORES, QUE DEVEM BLOQUEAR 98% DA UVB. SEGUNDO LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL.

PARA EVITAR QUE OS PROTETORES IMPEÇAM O BRONZEAMENTO - OS FABRICANTES DE COSMÉTICOS PASSARAM A ADICIONAR OS PSORALENOS, QUE NA PRESENÇA DE UVA INTENSIFICAM A PRODUÇÃO DE MELANINA.

ISTO É PROIBIDO EM PAÍSES DO PRIMEIRO MUNDO.!!!

Dr.VOLNER KIRCHHOFF - INPE - CRIA UM INDICE DE EXPOSIÇÃO ASSOCIANDO A COR DA PELE COM O TEMPO, PARA AS DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.