Briefing Document: Organização, Replicação e Reparação do DNA

1. Importância Biomédica do DNA

A informação genética contida no DNA dos cromossomos é crucial para a adaptabilidade e diversidade dos organismos. No entanto, falhas nos processos de replicação, recombinação, transposição e conversão gênica podem levar a doenças. Mutações, que são alterações na sequência de bases do DNA, ocorrem em aproximadamente uma em cada 10^6 divisões celulares e podem resultar de replicação defeituosa, transposição ou falhas na reparação do DNA. Fatores como vírus, produtos químicos, luz ultravioleta e radiação ionizante aumentam a taxa de mutação. Mutações em células germinativas são transmitidas verticalmente (doenças hereditárias), enquanto mutações somáticas afetam apenas gerações sucessivas de células.

2. Organização do DNA em Cromatina e Cromossomos

2.1. Genoma Humano e Condensação do DNA

O genoma haploide humano possui cerca de 3 x 10^9 pares de bases (pb) de DNA, divididos em 23 cromossomos lineares. Sendo diploides, os humanos têm 23 pares de cromossomos (22 autossomos e 2 sexuais). Embora o DNA genômico humano possa medir metros de comprimento, ele se encaixa no núcleo celular (micrômetros de diâmetro) graças à sua condensação. Essa condensação é parcialmente induzida pela associação do DNA com proteínas carregadas positivamente, as histonas, formando um complexo DNA-histona chamado nucleossomo.

2.2. Cromatina e Nucleossomos

A cromatina é o material cromossômico nos núcleos das células eucarióticas, composta por moléculas de DNA de fita dupla (dsDNA), histonas, proteínas não-histônicas e uma pequena quantidade de RNA. As histonas são as proteínas mais abundantes na cromatina e desempenham um papel integral na regulação gênica.

* **Nucleossomos:** São partículas esféricas densas (aproximadamente 10 nm de diâmetro) formadas por DNA enrolado em torno de um octâmero de histonas. O octâmero é composto por duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Cerca de 145-150 pb de DNA formam 1,75 voltas super-helicoidais em torno do octâmero.
* **Histonas:** São pequenas proteínas básicas. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 (histonas nucleares) são altamente conservadas entre as espécies, indicando uma função idêntica em todos os eucariotos. Seus terços amino-terminais são ricos em aminoácidos básicos e estão sujeitos a diversas modificações covalentes pós-traducionais (PTMs), como acetilação, metilação, fosforilação, ADP-ribosilação, monoubiquitilação e sumoilização. Essas PTMs modulam a estrutura e função da cromatina (ver Quadro 35-1).

2.3. Estruturas de Ordem Superior

Os nucleossomos se organizam em estruturas de ordem superior:

* **Fibrila de 10 nm:** Consiste em nucleossomos dispostos com suas bordas separadas por cerca de 30 pb de DNA ligador.
* **Fibra de cromatina de 30 nm:** A fibrila de 10 nm se super-enrola com seis ou sete nucleossomos por volta. A histona H1 parece estabilizar essa fibra.
* **Alças ou Domínios:** Em cromossomos na interfase, as fibras de cromatina se organizam em alças de 30.000 a 100.000 bp ancoradas em um arcabouço nuclear. Cada domínio pode corresponder a uma ou mais funções genéticas separadas.
* **Cromossomo mitótico:** Para formar um cromossomo mitótico, a fibra de 30 nm se compacta cem vezes mais. Os cromossomos metafásicos são as unidades funcionais macroscópicas para diversas funções do DNA, mas são quase completamente inativos transcricionalmente (ver Quadro 35-2).

2.4. Regiões da Cromatina "Ativas" e "Inativas"

A expressão diferencial da informação genética explica as diferenças entre os tipos celulares.

* **Eucromatina:** Cromatina transcricionalmente ativa ou potencialmente ativa, que se cora menos densamente. É mais sensível à digestão por DNase I, refletindo seu potencial de transcrição. As regiões hipersensíveis à DNase I (100-300 nucleotídeos) frequentemente se localizam a montante de genes ativos e indicam a interrupção da estrutura nucleossômica pela ligação de proteínas de fatores de transcrição reguladoras.
* **Heterocromatina:** Cromatina transcricionalmente inativa, densamente compactada durante a interfase. Geralmente contém alto teor de 5-metildesoxicitidina (meC) e histonas com níveis baixos de modificações ativadoras e níveis altos de PTMs repressoras.
* **Constitutiva:** Sempre condensada e inativa, encontrada em centrômeros e telômeros.
* **Facultativa:** Condensada em alguns momentos e ativamente transcrita em outros. Exemplo: um dos cromossomos X femininos.

2.5. Centromeros e Telômeros

* **Centrômeros:** Regiões ricas em adenina-timina (A-T) com sequências de DNA repetidas, que variam de 10^2 a 10^6 pb. Contêm nucleossomos com a variante CENP-A da histona H3 e outras proteínas específicas, formando o cinetocoro, essencial para a segregação cromossômica durante a mitose.
* **Telômeros:** Estruturas nas extremidades dos cromossomos, consistindo em repetições curtas ricas em TG (nos humanos, 5'-TTAGGG-3'). A telomerase, uma DNA polimerase dependente de RNA, é responsável pela síntese e manutenção de seu comprimento. O encurtamento dos telômeros está associado a transformações malignas e ao envelhecimento.

2.6. Genes e Introns

As regiões codificadoras de proteínas (exons) são frequentemente interrompidas por sequências interpósitas de DNA não codificantes (introns). Os introns são removidos do RNA precursor (hnRNA) por um processo de splicing, unindo os exons para formar o mRNA maduro. Embora a função dos introns não seja totalmente clara, eles podem permitir o splicing diferencial, aumentando o número de proteínas produzidas por um único gene, e facilitar a reorganização genética.

2.7. DNA de Sequência Única e Repetitiva

O genoma eucariótico pode ser dividido em DNA de sequência única (não repetitivo) e DNA de sequência repetitiva.

* **DNA de sequência única:** Inclui genes de cópia única que codificam proteínas.
* **DNA repetitivo:Altamente repetitivo:** Sequências de 5 a 500 pb repetidas muitas vezes em tandem, frequentemente agrupadas em centrômeros e telômeros (1 a 10 milhões de cópias por genoma haploide). A maioria é transcricionalmente inativa, mas algumas têm função estrutural.
* **Moderadamente repetitivo:** Menos de 10^6 cópias por genoma haploide, intercaladas com sequências únicas. Incluem LINEs (long interspersed nuclear elements) e SINEs (short interspersed nuclear elements), que são retrotransposons (transpostos via RNA intermediário). A família Alu, um tipo de SINE, representa cerca de 10% do genoma humano. A transposição desses elementos pode ter consequências desastrosas, como a neurofibromatose.
* **Microssatélites:** Sequências curtas (2-6 pb) repetidas em tandem até 50 vezes, dispersas ou agrupadas. São úteis no mapeamento genético. A expansão de repetições de trinucleotídeos pode causar doenças como a doença de Huntington (CAG) e a síndrome do X frágil (CGG).

2.8. DNA Mitocondrial (mtDNA)

As mitocôndrias humanas contêm 2 a 10 cópias de uma pequena molécula circular de dsDNA de ~16 kbp, que constitui cerca de 1% do DNA celular total. O mtDNA codifica RNA ribossômico e de transferência específicos e 13 proteínas-chave da cadeia respiratória. O mtDNA é de herança materna não mendeliana, e mutações no mtDNA podem causar miopatias, distúrbios neurológicos e algumas formas de diabetes mellitus (ver Quadro 35-3).

3. Replicação do DNA

3.1. Visão Geral

A replicação do DNA é fundamental para transmitir informações genéticas à descendência, devendo ser completa e precisa para manter a estabilidade genética. É um processo complexo que envolve múltiplos sistemas enzimáticos e mecanismos de verificação. O DNA é replicado de forma semiconservativa.

3.2. Estágios da Replicação do DNA (ver Quadro 35-4 e Figura 35-13)

1. **Identificação das origens de replicação (ori):** Em *E. coli*, o oriC é ligado pela proteína dnaA. Em eucariotos, as sequências de replicação autônoma (ARS) contêm o elemento de origem de replicação (ORE), ligado pelo complexo de reconhecimento de origem (ORC).
2. **Desenrolamento do dsDNA:** Ação de helicases (dnaB em *E. coli*, MCM em eucariotos) para separar as fitas, formando ssDNA. Proteínas de ligação de fita simples (SSB em *E. coli*, RPA em eucariotos) estabilizam o ssDNA.
3. **Formação da forquilha de replicação; síntese do primer de RNA:** A primase (dnaG em *E. coli*, DNA pol α em eucariotos) sintetiza um primer de RNA curto (10-200 nucleotídeos), essencial para o início da síntese de DNA, pois as DNA polimerases não podem iniciar *de novo*.
4. **Iniciação da síntese e alongamento do DNA:** As DNA polimerases (Pol III em *E. coli*, Pol δ e ε em eucariotos) sintetizam DNA na direção 5' para 3', adicionando desoxirribonucleotídeos trifosfato complementares ao molde.
* **Fita líder (leading strand):** Sintetizada continuamente.
* **Fita lagging (lagging strand):** Sintetizada descontinuamente em fragmentos curtos (100-250 nucleotídeos em eucariotos, 1-5 kb em procariotos) chamados Fragmentos de Okazaki (ver Figura 35-16). Após a síntese, os primers de RNA são removidos, os espaços são preenchidos por DNA polimerase, e os fragmentos são selados por DNA ligases.
1. **Formação das bolhas de replicação:** A replicação é bidirecional e ocorre a partir de múltiplas origens em cada cromossomo eucariótico, formando bolhas de replicação (ver Figura 35-17).
2. **Reconstituição da estrutura da cromatina:** Após a replicação, o DNA recém-sintetizado é rapidamente montado em nucleossomos, um processo facilitado por chaperonas de histonas.

3.3. Enzimas Chave na Replicação (ver Quadro 35-5 e 35-6)

* **DNA Polimerases:** Catalisam a polimerização de desoxirribonucleotídeos. Possuem propriedades de alongamento da cadeia, processividade e correção.
* **Helicases:** Desenrolam o DNA de forma processiva, impulsionadas por ATP.
* **Topoisomerases:** Aliviam a tensão torsional resultante do desenrolamento do DNA. Elas cortam e religam as fitas de DNA, sem requerer ATP para religar (Topoisomerase I) ou com gasto de ATP (Topoisomerase II).
* **Primases (DNA primases):** Iniciam a síntese de primers de RNA.
* **Proteínas de ligação de fita simples (SSB/RPA):** Evitam a re-associação prematura das fitas de ssDNA.
* **DNA Ligases:** Selam os cortes de fita simples entre os fragmentos de Okazaki.

3.4. Controle do Ciclo Celular e Replicação do DNA

A síntese de DNA ocorre na fase S do ciclo celular eucariótico, separada das fases G1 e G2 (ver Figura 35-20). A transição entre as fases é regulada por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs) (ver Figura 35-21 e Quadro 35-7). Por exemplo, as ciclinas D ativam CDK4 e CDK6, que fosforilam a proteína Rb (supressor tumoral), liberando o fator de transcrição E2F e permitindo a progressão para a fase S. A replicação do DNA é licenciada para ocorrer apenas uma vez por ciclo celular.

4. Reparação do DNA

4.1. Importância e Mecanismos

O reparo do DNA danificado é fundamental para manter a integridade genômica e prevenir mutações. O DNA está sujeito a agressões químicas, físicas e biológicas diárias (ver Quadro 35-8). As células eucarióticas possuem cinco vias principais de reparo, cada uma envolvendo múltiplas proteínas:

* **Reparo por excisão de nucleotídeos (NER):** Repara danos volumosos como dímeros de pirimidina induzidos por UV.
* **Reparo de erros de pareamento (MMR):** Corrige erros de replicação, inserções e deleções.
* **Reparo por excisão de base (BER):** Remove bases alteradas quimicamente ou apurínicas/apirimidínicas.
* **Recombinação homóloga (HR):** Repara quebras de fita dupla (DSBs) usando uma fita homóloga intacta como molde, ocorrendo nas fases S, G2 e M.
* **Reparo de junção de extremidades não homólogas (NHEJ):** Repara DSBs ligando diretamente as extremidades quebradas, predominante nas fases G0/G1.

4.2. Doenças Associadas a Defeitos de Reparo

Mutações em genes de reparo do DNA aumentam drasticamente a suscetibilidade ao câncer e causam doenças específicas (ver Quadro 35-9), como Xerodermia Pigmentosa (NER), Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (MMR) e susceptibilidade ao câncer de mama (BRCA1, BRCA2 em HR).

4.3. Resposta ao Dano do DNA

A resposta celular ao dano do DNA envolve sensores, transdutores e mediadores (ver Figura 35-23). O supressor tumoral p53 desempenha um papel chave na regulação dos pontos de controle G1 e G2. Em resposta ao dano do DNA, p53 é estabilizado e ativa a transcrição de genes que induzem a parada do ciclo celular (ex: p21) para permitir o reparo, ou a apoptose (morte celular programada) se o dano for muito extenso. Mutações em p53 são comuns em cânceres humanos, pois a perda de sua função permite que células danificadas se dividam descontroladamente.

5. Alteração e Reorganização do Material Genético

5.1. Mutações

Alterações na sequência de bases (inserções ou deleções - indels) podem levar a produtos gênicos alterados ou à modificação da expressão gênica.

5.2. Recombinação Cromossômica

Troca de informação genética entre cromossomos homólogos, principalmente durante a meiose. Geralmente resulta em troca igual e recíproca. O cruzamento desigual pode levar a deleções ou inserções/duplicações, como observado nas hemoglobinopatias Lepore e anti-Lepore (ver Figura 35-10).

5.3. Integração Cromossômica Viral

Alguns vírus (bacteriófagos e vírus animais) podem integrar seu DNA (ou DNA sintetizado a partir de RNA viral, no caso de retrovírus) no genoma do hospedeiro. Essa integração pode ser sítio-específica ou mostrar preferências de sítio, podendo ser mutagênica.

5.4. Transposição (Elementos Móveis)

Pequenos elementos de DNA, como a família Alu (retrotransposons), podem se transpor para dentro e para fora do genoma hospedeiro, afetando a função de sequências vizinhas e a evolução. A descoberta de "genes processados" (DNA idêntico ao mRNA maduro, sem introns) sugere transcrição reversa de mRNA e integração por transposição.

5.5. Conversão Gênica

Mecanismo que causa mudanças rápidas no material genético, onde sequências similares em cromossomos homólogos ou não homólogos podem se parear e eliminar sequências desemparelhadas, levando à homogeneização de famílias de sequências repetidas.

5.6. Reorganização de Genes de Imunoglobulinas

Em mamíferos, rearranjos genéticos específicos ocorrem durante o desenvolvimento e diferenciação, como o reposicionamento dos genes VL e CL nas células produtoras de imunoglobulinas, formando uma única unidade de transcrição.

Conclusão

O estudo do DNA abrange desde sua estrutura altamente organizada em cromatina e cromossomos, passando pelos intrincados mecanismos de replicação que garantem a fidelidade da informação genética, até os múltiplos sistemas de reparo que corrigem danos e previnem doenças. A compreensão desses processos é fundamental para a biologia celular e tem implicações diretas na compreensão e tratamento de doenças genéticas e câncer. A pesquisa contínua sobre a regulação do ciclo celular, os mecanismos de reparo e a dinâmica do genoma promete avanços significativos na medicina.