

Paulo Sérgio Pilz Augusto

Modelo Estatístico para a molécula de DNA



1910001257



Augusto, Paulo Sérgio Pilz.

Modelo estatístico para molécula de DNA / Paulo Sérgio Pilz

Augusto – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003

85 : il. ; 30 cm.

Orientador: Elso Drigo Filho

Co-orientador: José Roberto Ruggiero

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ácido desoxirribonucleico - Estrutura. 2. Ácido desoxirribonucleico - Modelos. 3. Ácido desoxirribonucleico – Forças.
I. Drigo Filho, Elso. II. Ruggiero, José Roberto. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 531.14

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Modelo Estatístico para a molécula de DNA

Paulo Sérgio Pilz Augusto

Tese a ser apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São
José do Rio Preto, São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutor em Física na área de Biofísica
Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Elso Drigo Filho

Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero



1.1257/04

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

São Paulo – Brasil

Dezembro – 2003



**'É preciso amar as pessoas como se
não houvesse amanhã...'**

Legião Urbana

Dedico

a minha mãe Delva Pilz Augusto, por tudo!

a minha esposa Egla Rodrigues Lima, cuja presença é fonte de persistência!

a minha irmã Fernanda, meus cunhados José, Derli e Edina e meus sobrinhos Lígia,

Maurício, Aline e Daniel, com carinho e saudade.

a Nosso Senhor Jesus Cristo, meu anjo da guarda!

Agradecimentos

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse executado.

Aos Profs. Drs. Elso Drigo Filho e José Roberto Ruggiero pela orientação, pelo voto de confiança e pelo incentivo ao longo desta caminhada.

Aos Profs. Drs. Luiz Carlos Pavlu e Roberto Tomasi da Universidade Federal de São Carlos, cuja competência e espírito muito contribuíram para que esse trabalho se tornasse uma realidade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Fontes Henriques do departamento de Física da Universidade Federal de Pelotas (RS), pela competência na chefia do departamento e que muito colaborou nesta tarefa.

Aos meus amigos e amigas de São José do Rio Preto, João, Neide, Rita, Paulo, Nair, Paula, Adriana e família, Luciano e aos meus amigos e amigas de Minas Gerais, Isolda, Mirlene, Ediomar, Jesualda, Eliara, Tio Chico e Família, cujo amor e carinho também colaboraram em momentos difíceis desta trajetória.

A Ilva, Secretária do Departamento de Física IBILCE-UNESP, pela colaboração técnica.

A todos os colegas do departamento pela amizade dedicada.

A minha mãe que forneceu as condições iniciais e pela presença constante.

Enfim, a todos os meus amigos deste Instituto.

A CAPES pelo apoio financeiro e a Universidade Federal de Pelotas (RS) por autorizar o afastamento, viabilizando a realização do presente trabalho.

A Deus por tudo.



Resumo

A compreensão do mecanismo de desnaturação térmica do DNA constitui um passo importante para o entendimento do complexo processo de transcrição gênica.

Nesta tese serão discutidos dois modelos para a desnaturação térmica do DNA: vibracional e rotacional. No modelo vibracional a molécula é modelada por duas cadeias de osciladores harmônicos acoplados por um potencial de Morse que simula as pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. O formalismo usado é o da Mecânica Estatística, em particular o operador integral de transferência. Os resultados obtidos permitem determinar a temperatura de desnaturação concordante com os dados experimentais e analisar esta transição em termos da capacidade calorífica. No modelo rotacional o DNA é modelado por duas cadeias de discos acopladas por um potencial de dupla sine-Gordon. Usando o mesmo formalismo do modelo anterior, mostra-se que não é possível haver desnaturação térmica, comprovado pela análise da capacidade calorífica. Entretanto, os resultados permitem inferir que os movimentos rotacionais são importantes no processo e um modelo vibro-rotacional complementaria a análise do mecanismo.



Abstract

Understanding the process of the thermal denaturation of DNA macromolecules is important in order to understand the transcription of the genetic information.

In this work, two models for thermal denaturation of DNA macromolecule are discussed: the vibrational and rotational one. In the vibrational model two chains of harmonic oscillators simulating the molecule, are linked by a Morse potential representing the H-bond between the nitrogenated bases. The formalism used is the Statistic Mechanics, in particular, the transfer integral operator. The results for this model are related with the melting temperature that is in agreement with the experimental data, and the transition can be analyzed in terms of the heat capacity. In the rotational model, the DNA is treated as two chains of disks linked by a double sine-Gordon potential. The same formalism used in the first model permits the conclusion that there is not thermal penetration. This fact is confirmed by the heat capacity analysis. However, the results leads to the conjecture that the rotating motions are important in the process and that a vibro-rotating model can be interesting in order to complete the analysis of the mechanism.



Índice

I – Introdução	1
II – Estruturas e forças que estabilizam o DNA	4
II.1 – Estrutura molecular do DNA	4
II.1.1 – Introdução	4
II.1.2 – Ácidos nucleicos	5
II.1.3 – Estrutura e funções dos nucleotídeos	6
II.1.4 – Polinucleotídeos	10
II.1.5 – A composição das bases do DNA	13
II.1.6 – Aspectos geométricos da hélice do DNA	16
II.1.7 – Flexibilidade do DNA	17
II.1.8 – A estrutura secundária do DNA	24
II.1.9 – Graus de liberdade dos pares de base	27
II.2 – Forças que estabilizam o DNA	29
II.2.1 – Introdução	29
II.2.1.1 – Desnaturação	29
II.2.2 – Caracterização das ligações de hidrogênio	31
II.2.3 – Interações entre átomos não ligados	35
II.2.4 – Interações base-base ao longo da cadeia	41
II.2.5 – Interações hidrofóbicas e dispersão de London	42
II.2.6 – Formação e ruptura da estrutura da dupla hélice mostra comportamento cooperativo	45
III – Modelo vibracional	48
III.1 – Descrição do modelo	48
III.2 – Estiramento médio dos pares de base	54
III.3 – Capacidade calorífica	58
IV – Modelo rotacional para a molécula de DNA	61



IV.1 – Descrição do modelo	61
IV.2 – Potencial para as pontes de hidrogênio na molécula de DNA	62
IV.3 – Capacidade calorífica	67
V – Conclusões	68
Referências	71
Apêndices	73



Índice de Figuras

Figura II-1: Uma cadeia de unidades nucleotídeos	5
Figura II - 2: (a) D - Ribose, (b) 2 - Desoxi - D - Ribose	6
Figura II - 3: Bases pirimidínicas de ácidos nucleicos	7
Figura II - 4: Bases purínicas de ácidos nucleicos	7
Figura II - 5: Esquema de um nucleosídeo	8
Figura II - 6: Esquema de nucleotídeos	8
Figura II - 7: Representação esquemática da cadeia polinucleotídica	10
Figura II - 8: A ligação diéster fosfato numa cadeia polinucleotídica	11
Figura II - 9. Segmento de uma das fitas do DNA	12
Figura II - 10: Pares de bases de Watson - Crick	14
Figura II - 11: Estrutura fina do B-DNA	18
Figura II - 12: Ângulos entre as bases de um par	20
Figura II - 13: Os sete ângulos de torção em unidade nucleotídica	21
Figura II - 14: Orientações estéricas	22
Figura II - 15: A dupla hélice do DNA	26
Figura II - 16: Principais graus de liberdade intra e inter pares de base	28
Figura II - 17: Uma representação esquemática da desnaturação do DNA	30
Figura II - 18: O espectro de absorbância ao UV do DNA nativo e desnaturado	31
Figura II - 19: Um exemplo de uma curva de desnaturação do DNA	32
Figura II - 20: Energia potencial repulsiva de interação de dois átomos	37



Figura II – 21: A flutuação da atração dipolo-dipolo induzido de London	38
Figura II – 22: A energia de interação London-van der Walls	40
Figura II – 23: Empilhamento de bases	42
Figura II – 24: Perfil de desnaturação	46
Figura III – 1: Três modelos de DNA	49
Figura III – 2: Análogo discreto do modelo de Barkley e Zimm	49
Figura III – 3: Curva representativa do Potencial de Morse	50
Figura III – 4: Estiramento médio $\langle y \rangle$ versus temperatura	57
Figura III – 5: Calor específico como função da temperatura absoluta	60
Figura IV-1: Secção reta do modelo constituído por duas pilhas (cadeias) de discos	61
Figura IV-2: Um ciclo do potencial dupla sine-Gordon	63
Figura IV-3: Periodicidade da função potencial dupla sine-Gordon	64
Figura IV-4: Variação angular como função da temperatura	66
Figura A – 1: Coordenadas de dois osciladores	78



Índice de Tabelas

Tabela II – 1: Proporções molares de bases em DNA	13
Tabela II – 2: Principais características geométricas do A-, B- e Z - DNA	15
Tabela II – 3: Comparação de valores de energia em ligações Covalentes e de H 33	
Tabela II – 4: Características geométricas de ligações de Hidrogênio	34
Tabela II – 5: Parâmetros para a energia de interação London-van der Walls	39
Tabela II – 6: Energias de empilhamento total	44
Tabela II – 7: Valores experimentais da temperatura de desnaturação	47
Tabela A – 1: Diâmetros moleculares para moléculas não polares esféricas	76



I - INTRODUÇÃO

Neste texto trabalhamos com uma das mais formidáveis moléculas existentes. Estamos falando do DNA ou ácido desoxirribonucleico que é uma macromolécula biológica gigante, linear sendo fundamental a toda espécie de vida, do nascimento, crescimento, desenvolvimento, reprodução e talvez estabelecendo o tempo de vida celular.

Ela carrega dentro de si as partículas fundamentais que estão por trás do sistema hereditário, os genes. Assim sendo, ela é portadora de uma propriedade única dentre todas as moléculas, a de reproduzir a si própria criando uma cópia idêntica.

Estas macromoléculas biológicas são compostas por muitos milhares, eventualmente milhões de átomos mantidos juntos em arranjos espaciais precisamente definidos. Cada uma dessas macromoléculas carrega informação específica. Incorporadas em suas estruturas, existem séries de mensagens biológicas que podem ser lidas em suas interações com outras moléculas, capacitando-as a exercer uma função precisa. Em organismos complexos tais funções vão muito além da transmissão das características hereditárias atuando em setores necessários a manutenção da espécie.

A dinâmica da transcrição do DNA é um dos problemas mais fascinantes da biofísica moderna, porque está na base da vida. Contudo, é também um problema extremamente difícil devido à complexidade intrínseca da macromolécula, bem como ao complexo papel desempenhado pela polimerase do RNA no processo. Recentemente, muito trabalho tem sido feito sobre a dinâmica não linear da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA). Isto tem sido estimulado em parte, pelas novas idéias sobre o possível papel de ondas não lineares na regulação dos processos biológicos, ao nível molecular.

Sabe-se que uma desnaturação local do DNA está envolvida no processo de transcrição⁽¹⁾, de forma que é interessante investigar a desnaturação térmica da dupla hélice, como um passo preliminar para a compreensão deste processo. Este trabalho pretende discutir e investigar dois modelos usados para descrever a molécula de DNA, em especial naquilo que se refere à desnaturação. A ferramenta básica a ser usada é o operador integral de transferência, com ele é possível obter soluções analíticas exatas dos modelos propostos.



Neste trabalho, setorizamos o assunto estudado em partes procurando desenvolver os aspectos essenciais de cada uma tornando-as tão abrangentes quanto possível.

Iniciamos com uma descrição da estrutura do DNA procurando desenvolver o tema de forma a deixar claras as idéias relacionadas com as assimetrias configuracionais da molécula. Os constituintes básicos e os principais arranjos estruturais que permitem ao DNA cumprir sua função biológica serão apresentados. Em seguida, passamos a estudar as forças que mantêm essas estruturas estabilizadas, concentrando-nos nas forças provenientes das ligações de Hidrogênio, forças hidrofóbicas e forças de dispersão de London.

A macromolécula de DNA é extremamente complexa e apresenta uma estrutura em dupla hélice, como fitas enroladas sobre si mesmas, tendo um calibre com algumas dezenas de ângstrons, mas com comprimentos que podem atingir quilômetros quando compactada dentro das células. Vamos fixar nossa atenção no DNA tipo B, cuja estrutura foi determinada por métodos de difração de Raios X, por Watson e Crick⁽²⁾. O inerente vínculo com a vida apresentado pelo DNA e sua alta complexidade molecular levou ao desenvolvimento de um número muito grande de trabalhos na busca de uma melhor compreensão de sua estrutura e funções.

Apesar da complexidade da molécula, modelos simplificados têm sido usados para estudá-la. O modelo mais simples foi considerar o DNA como sendo um cilindro unidimensional. Entretanto, outros modelos foram desenvolvidos, em particular, modelos discretos bidimensionais. No entanto, podemos dizer que a despeito de todos os esforços feitos nesse sentido, muitos pontos ainda precisam ser melhor explorados e uma grande questão que ainda perdura é sobre qual é o melhor modelo a ser adotado para estudar determinado fenômeno..

Neste trabalho analisaremos em primeiro lugar um modelo planar para o modo vibracional do DNA, usando para isto métodos analíticos com o auxílio do operador integral de transferência e da mecânica estatística clássica⁽³⁾. Mostramos que o modelo passa por uma mudança de fase e determinamos graficamente a temperatura de transição com gráficos do estiramento médio dos pares de base em função da temperatura e do calor específico em função da temperatura. Por último, desenvolvemos um modelo para o modo rotacional do DNA, usando técnicas similares as do modelo vibracional. Mostramos que



este modo não conduz a mudança de fase, podendo em conjunção com o modo vibracional atuar como colaborador neste processo.

II - ESTRUTURAS E FORÇAS QUE ESTABILIZAM O DNA

II - 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO DNA

II-1.1 - Introdução

O DNA é fundamental a toda espécie de vida, pois, ele carrega toda a informação necessária do nascimento, crescimento, desenvolvimento e provavelmente estabelece a vida média de cada espécie.

O DNA é um polímero formado por desoxirribonucleotídeos unidos, por ligações fosfodiéster, que formam uma fita dupla. A forma mais comum do DNA é conhecida como B – DNA e possui as características estruturais descritas por James Watson e Francis Crick².

O DNA está sempre empacotado de forma a ‘acomodar-se’ em um espaço de dimensões micrométricas, tanto em estruturas abertas como nos procariocitos (células primárias, sem núcleo – bactérias) ou densamente empacotado em uma unidade específica (no núcleo celular), como nos eucariócitos (as células mais evoluídas, com núcleo).

Como ‘regra’, cada célula carrega uma cópia da molécula de DNA; e em organismos pluricelulares, as cópias são idênticas em cada célula. O DNA é separado em genes; unidades fundamentais da hereditariedade (o número de genes varia de alguns milhares até algumas dezenas de milhares por cópia), a maioria dos quais codificando produtos necessários à vida celular ou suas contribuições para a vida de organismos multicelulares.



A informação genética formal (ou código sequencial) está sempre depositada sobre uma única fita da dupla hélice, embora ambas as fitas carreguem genes.

O DNA pode ser considerado como um depósito passivo de informação, como expressão da informação genética são necessárias várias etapas (ou passos) executadas por ‘equipamentos’ especializados. A expressão do gene envolve sucessivamente a transcrição e tradução. Na transcrição, o gene é transcrito do DNA por uma enzima, RNA polimerase (RNAP), em RNA mensageiro, mRNA, enquanto na tradução o mensageiro é traduzido para o produto genético (proteína), por uma fábrica especial, o ribossomo. A expressão do gene é cuidadosamente controlada e regulada para assegurar o produto genético em quantidades e no tempo e lugares corretos, requeridos pelas circunstâncias reais (intra e/ou extracelular). Ao descrever a transcrição com mais detalhe, depara-se com processos não lineares, o que tem estimulado pesquisas neste sentido, pelo mundo.

II-1.2 – Ácidos Nucléicos

A cadeia dos ácidos nucleicos⁽⁴⁻⁶⁾ é composta de unidades pentose (furanose) conectadas por unidades fosfato em alternância regular. Bases purina e pirimidina são atreladas às unidades açúcar em uma sequência que fornece o código genético; (figuras II – 1, 7). A unidade, base, açúcar, fosfato é denominada um nucleotídeo.

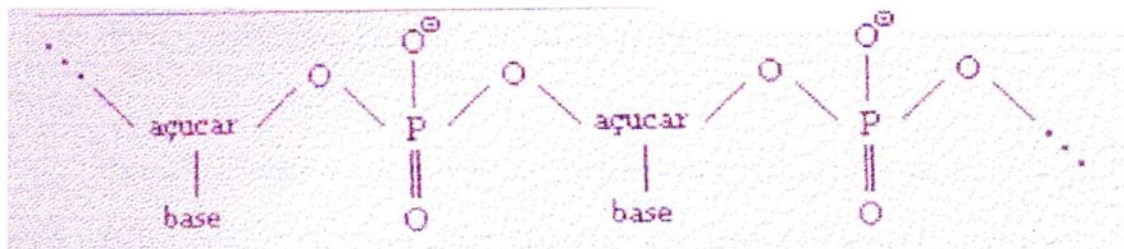


Figura II-1: Uma cadeia de unidades nucleotídeos

Duas classes de ácidos – nucléicos são especialmente importantes, aquela na qual o açúcar é D – Ribose (chamados ácidos – ribonucleicos RNA) e aquela na qual o açúcar é 2 – Desoxi – D – Ribose (chamados ácidos - desoxirribonucleicos ou DNA) (Figura II – 2). O DNA ocorre no núcleo celular (nos eucariotos) e nos procariotos (sem núcleo, mas com membrana celular) ocorre interiormente à membrana celular, distribuído dentro da estrutura da célula, e é o material que transmite informação genética de uma geração à próxima (em algumas viroses, o RNA desempenha esse papel).

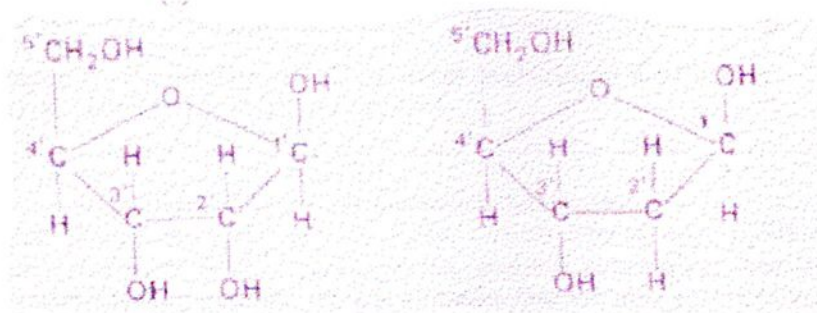


Figura II – 2: (a) D – Ribose, (b) 2 – Desoxi – D – Ribose

Ligado ao açúcar está um heterociclo nitrogenado, a base. Esta pode ser uma purina ou uma pirimidina. Cada tipo de ácido contém apenas quatro diferentes tipos de bases nitrogenadas: O DNA contém adenina, guanina, citosina e timina, enquanto que o RNA contém adenina, guanina, citosina e uracila.

II-1.3 – Estrutura e funções dos Nucleotídeos.

Os nucleotídeos são, dentre todos os componentes moleculares de células vivas, os mais versáteis considerando suas propriedades físicas e químicas. Nenhuma outra classe de moléculas participa de tantas e tão diversas funções essenciais à vida.

Os ácidos nucleicos são polímeros, cuja unidade é denominada um monômero, assim iremos agora ver os componentes de um nucleotídeo, o monômero, dos ácidos nucleicos.

Um nucleotídeo é uma associação de açúcar, fosfato e base, sendo ele o monômero do polímero mostrado em duas formas similares nas figuras II – 1 e II – 7. As bases dos nucleotídeos são moléculas planares, aromáticas (anel benzênico), e heterocíclicas; derivadas de uma pirimidina ou de uma purina (Figura II – 3, 4).

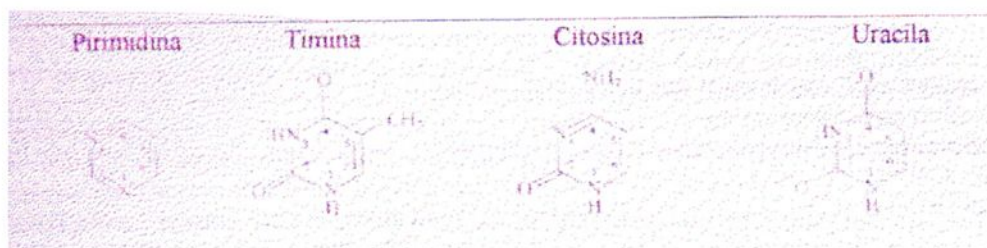


Figura II – 3: Bases pirimidínicas de ácidos nucleicos; a Citosina (C) é encontrada no DNA e RNA, a Timina (T) é encontrada apenas no DNA e a Uracila (U) apenas no RNA.

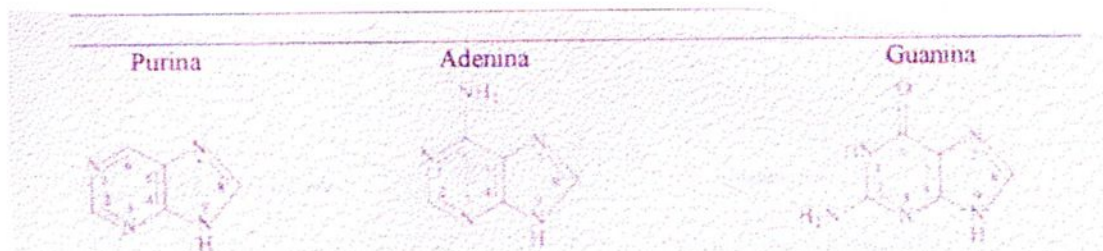


Figura II – 4: Bases purínicas de ácidos nucleicos; as duas formas, Adenina (A) e Guanina (G) são encontradas no DNA e no RNA.

Quando uma das bases está ligada a pentose, o glicosídeo resultante é denominado nucleosídeo (Figura II – 5). Os nucleosídeos são chamados adenosina, guanosina, citidina e uridina.

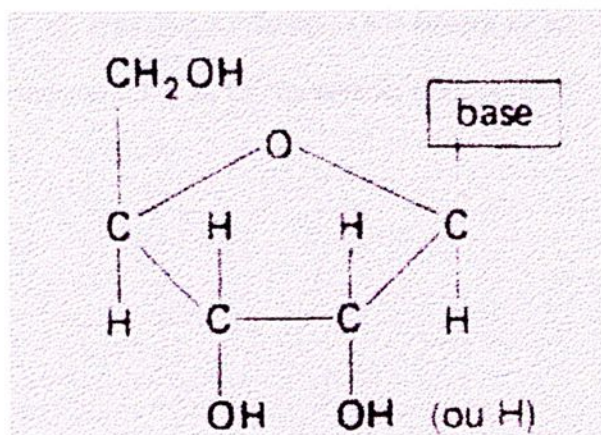


Figura II – 5: Esquema de um nucleosídeo.

A unidade repetitiva de um polímero tipo ácido nucléico é um nucleosídeo com um grupo fosfato ligado ao carbono 5' (Figura II – 6). A molécula é chamada nucleosídeo monofosfato ou nucleotídeo. Um nucleotídeo pode ter mais de um grupo fosfato, como no caso do ADP e do ATP. Nucleotídeos são as unidades básicas formadoras dos ácidos nucléicos.

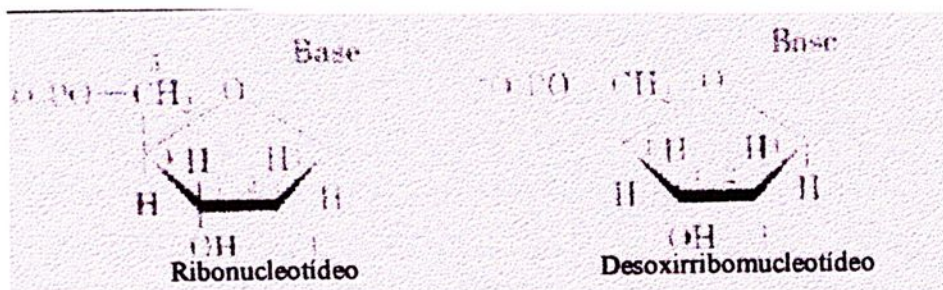


Figura II – 6: Esquema de nucleotídeos: a base púrica ou pirimidínica está ligada ao $\text{C1}'$, e pelo menos um fosfato também está ligado.

Nos ribonucleotídeos a pentose é ribose, e em desorribonucleotídeos (ou apenas desoxinucleotídeos) o açúcar é a 2' – desoxirribose, isto é, o grupo hidroxila não está presente. Observe que os números marcados com apóstrofo se referem aos átomos da

pentose, enquanto os não assinalados referem-se aos átomos da base nitrogenada. O grupo fosfato pode estar ligado ao C3' e ao C5' da pentose (Figura II – 6).



II-1.4 – Polinucleotídeos

De maneira similar à mostrada na figura II – 1, a cadeia polinucleotídica, pode ser representada como na figura II – 7. Para formar um ácido nucléico os nucleotídeos são interligados por ligações fosfodiéster. Esta ligação está mostrada na figura II – 8. O grupo fosfato liga o carbono 3' de um nucleotídeo ao carbono 5' de outro, formando a ligação fosfodiéster. A cadeia polipeptídica consiste de uma “espinha dorsal” de açúcares interligados por grupos fosfato com diferentes bases emergindo da cadeia (Figura II – 8). O ácido ribonucléico, RNA, é constituído de uma cadeia polinucleotídica com este arranjo, diz-se que ele possui “fita única” Figura II – 8.

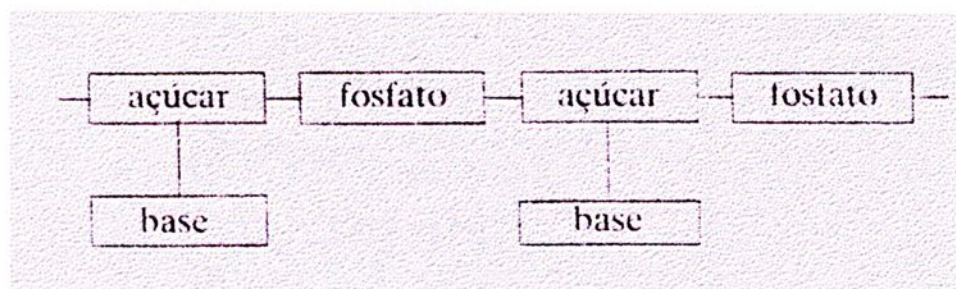


Figura II – 7: Representação esquemática da cadeia polinucleotídica.

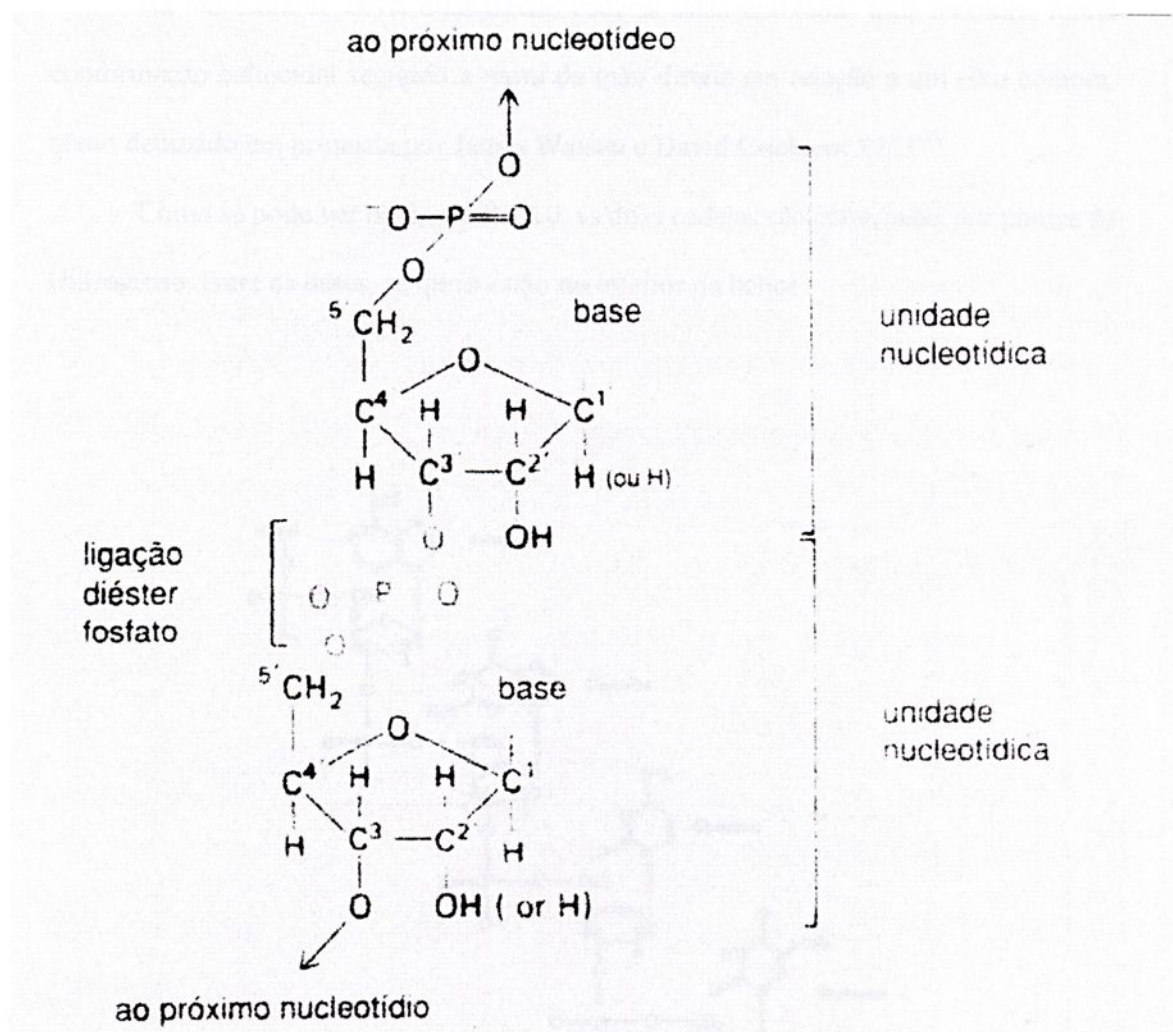


Figura II – 8: A ligação diéster fosfato (ou fosfodiéster) numa cadeia polinucleotídica une o Carbono 3' de um nucleotídeo ao Carbono 5' do nucleotídeo seguinte.

Nos ácidos nucléicos, as bases purinas estão atadas à cadeia principal por uma ligação entre o Nitrogênio 9 (das bases) com o Carbono 1', designado 1' por estar da pentose açúcar. As bases pirimidinas estão atadas por seu Nitrogênio 1 das bases com o Carbono 1' da pentose. A ligação fosfato entre unidades pentose conecta o Carbono 5' de uma com o Carbono 3' da sua vizinha. A cadeia é convencionalmente escrita com a unidade pentose 5' – OH, à esquerda e a 3' – OH à direita, como mostrado na figura II – 9.

Na molécula de DNA duas dessas cadeias estão enroladas uma na outra, numa conformação helicoidal segundo a regra da mão direita em relação a um eixo comum, como deduzido em primazia por James Watson e David Crick em 1953⁽²⁾.

Como se pode ver na figura II – 10, as duas cadeias são conectadas por pontes de Hidrogênio entre as bases, as quais estão no interior da hélice.

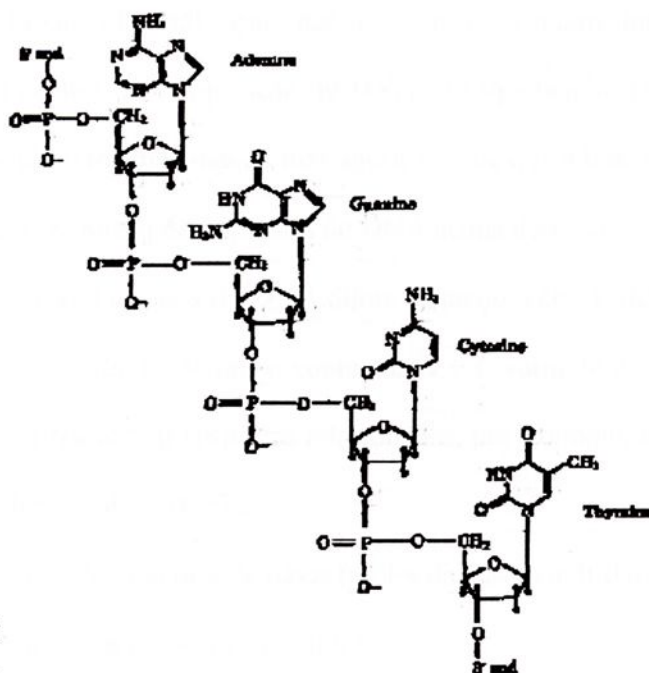


Figura II – 9. Segmento de uma das fitas do DNA. As bases que aparecem à direita na figura original acima⁽⁶⁾, são respectivamente: Adenina, Guanina, Citosina e Timina.

Os planos dos anéis de açúcar (os quais são realmente dobrados) são aproximadamente perpendiculares aos planos das bases. Os requisitos relativos à distribuição espacial dos átomos na molécula são tais que uma adenina deve estar

emparelhada com uma timina da outra cadeia enquanto uma guanina deve estar emparelhada com uma citosina.

II - 1.5 - A composição das bases do DNA

Embora pareça não haver regras na composição dos nucleotídeos em moléculas típicas de RNA, o DNA possui um número de resíduos de adenosina igual ao de timina ($A \equiv T$) e um número de resíduos de guanina igual ao de citosina ($G \equiv C$). Essas relações conhecidas como 'regra de Chargaff'⁽⁴⁾, foram descobertas em fins dos anos 40 (Séc.XX) por Erwin Chargaff, que desenvolveu o primeiro método quantitativo confiável para a análise da composição do DNA. O significado da regra de Chargaff não foi compreendido imediatamente, mas agora se sabe que a base estrutural para essa regra é derivada da natureza da dupla fita do DNA acima descrita.

A composição das bases do DNA difere bastante entre os diversos organismos. Em diferentes espécies de bactérias, o conteúdo $G + C$ varia de 25 a 75%, contudo, é mais ou menos constante entre espécies relacionadas, por exemplo, em mamíferos, $G + C$ varia de 39 a 46% (Tabela II - 1).

Tabela II - 1: Proporções molares de bases (moles da base por 100 moles do fosfato) em DNA de várias fontes, dados de vários autores.

Fonte de DNA	Adenina	Guanina	Citosina	Timina
Timo bovino	28,2	21,5	21,2	27,8
Esperma bovino	28,7	22,2	20,7	27,2
Medula de rato	28,6	21,4	20,4	28,4
Homo Sapiens	30,3	19,5	19,9	30,3
Germe de Trigo	27,3	22,7	16,8	27,1
Fermento (levedura)	31,3	18,7	17,1	32,9
E. coli	26,0	24,9	25,2	23,9
M. Tuberculosis	15,1	34,9	35,4	14,6
$\phi X174$	24,3	24,5	18,2	32,3

A Figura II – 10 mostra o emparelhamento entre pares de base, todas as bases são emparelhadas desta maneira ao longo de todo o comprimento da hélice, portanto, as cadeias devem ser necessariamente complementares na sequência. Elas também correm em sentidos opostos, a sequência principal de átomos das cadeias vai de um sentido em uma cadeia e a um sentido oposto na outra.

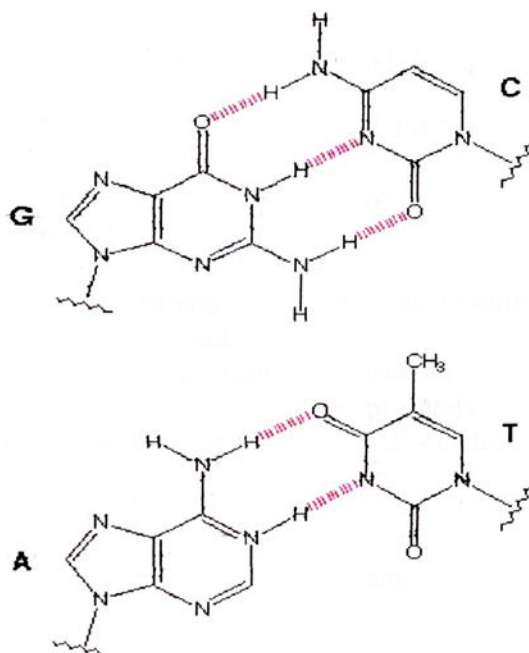


Figura II – 10: Pares de bases de Watson – Crick. Acima temos dois pares de bases da dupla hélice do ácido desoxirribonucléico (DNA), estas estruturas são internas a dupla hélice e cada cadeia compõe uma fita e como temos duas cadeias, temos duas fitas. Em cima uma guanina está conectada por três pontes de hidrogênio (linhas tracejada) à citosina; em baixo temos a adenina conectada à timina por três pontes de hidrogênio.

A dupla hélice de DNA pode assumir várias estruturas distintas, dependendo da composição do solvente e da sequência de bases. As principais variantes são B - DNA, A - DNA e Z - DNA, cujos dados geométricos estão indicados na Tabela II – 2.

Tabela II – 2: Principais Características geométricas das estruturas do A-, B-, e Z – DNA^(5,6).

	A	B	Z
Sentido da hélice	à direita	à direita	à esquerda
diâmetro	~26 Å	~20 Å	~18 Å
pares de base por volta helicoidal	11	10	12 (6 dímeros)
torção da hélice	33°	36°	60° (por dímero)
por par de base			
passo da hélice	28 Å	34 Å	45 Å
(elevação por volta)			
elevação da hélice	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
por par de base			
inclinação da base	20°	6°	7°
perpendicular ao eixo da hélice			
sulco maior	estreita profunda	e larga e profunda	acentuada
sulco menor	larga e rasa	estreita profunda	e estreita e profunda
conformação do anel de C3' - endo ribose		C2' - endo	C2' - endo em pirimidinas C3' - endo em purinas
ligação glicosídica	anti	anti	anti (pirimidina) syn (purina)

II-1.6 - Aspectos Geométricos da Hélice do DNA

O DNA é um polímero de desoxirribonucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster que formam uma fita dupla (figuras; II – 6, 8 e 15). A forma mais comum do DNA é conhecida como B – DNA e possui as características estruturais descritas por James Watson e Francis Crick⁽²⁾, ou seja:

1. – As duas fitas polinucleotídeas antiparalelas são enroladas em torno de um eixo comum, com orientação à direita produzindo uma dupla hélice com $\sim 20\text{\AA}$ de diâmetro.
2. – Os planos das bases nucleotídicas, que formam pares unidos por pontes de Hidrogênio são quase perpendiculares ao eixo da hélice. No B – DNA, as bases ocupam o centro da hélice, ao passo que o esqueleto de açúcar-fosfato ocupa a posição externa, formando as cavidades maiores e menores (ver figuras II – 15).
3. – Cada par de bases possui aproximadamente a mesma largura (ver figura II – 10), o que contribui para a simetria quase perfeita da molécula de DNA, independentemente da composição das bases. Os pares de bases A-T e G-C são interconvertíveis: eles podem substituir um ao outro na dupla hélice, sem alterar as posições do átomo $\text{C1}'$ do esqueleto açúcar-fosfato. Da mesma forma os pares de Watson – Crick podem ser alterados (i.e., alteração de G – C para C – G ou A – T para T – A).
4. – O B – DNA “ideal” tem cerca de 10 pares de bases (pb) em cada volta (cada pb promove uma torção de 36° na hélice) e, como as bases aromáticas possuem uma espessura de van der Waals de $3.4\text{\AA}$, a hélice possui um passo de cerca de $34\text{\AA}$ (ver, por exemplo, figura II – 11 e II – 15).



As geometrias dessas moléculas estão resumidas na Tabela II – 2. Aspectos da estrutura B – DNA podem ser vistos também na figuras II – 15. Em condições desidratantes, o B – DNA sofre uma alteração conformacional reversível para A – DNA, que possui uma hélice mais larga e achatada, do que o B – DNA, e como este é orientada para a direita. O A – DNA possui 11 pb por volta e um passo de 28Å, o que lhe confere um espaço axial oco (ou buraco axial). No A – DNA, o eixo não atravessa os pares de bases, porque estes estão inclinados 20° em relação a este eixo. Por este motivo o A – DNA possui uma cavidade maior mais profunda e uma cavidade menor muito rasa.. Assim, o A – DNA pode ser descrito como uma fita chata enrolada em torno de uma cavidade cilíndrica de 6Å de diâmetro⁽⁴⁾.

Cerca de 25 anos após a descoberta de Watson – Crick , foi encontrada uma dupla hélice orientada à esquerda. Essa estrutura denominada Z – DNA possui 12 pares de bases por volta, um passo de 45Å, uma cavidade menor mais profunda e uma cavidade maior não distinguível.

II – 1.7 - Flexibilidade do DNA

As formas estruturalmente distintas do DNA; A, B e Z, parecem não poder sofrer interconversão in-vivo. Em vez disso, a transição de uma forma para outra requer condições fisiológicas incomuns, por exemplo; baixa umidade ou influência de proteínas que se ligam ao DNA. Além disso, moléculas reais de DNA desviam-se das estruturas ideais descritas acima e na Tabela II – 2.

Estruturas por Raios – X de segmentos de B – DNA revelam que resíduos individuais alteram significativamente a conformação média de uma maneira que depende da sequência. Por exemplo, pode ocorrer entre duas bases de um par uma saída



da situação planar por elevação de $0.5\text{\AA}$, juntamente com uma torção de alguns graus (ver figuras II – 11a, 11b e 12), se o DNA tiver 10^6 pares de bases, essa alteração é multiplicada por um número muito grande, levando a uma alteração conformacional significativa.

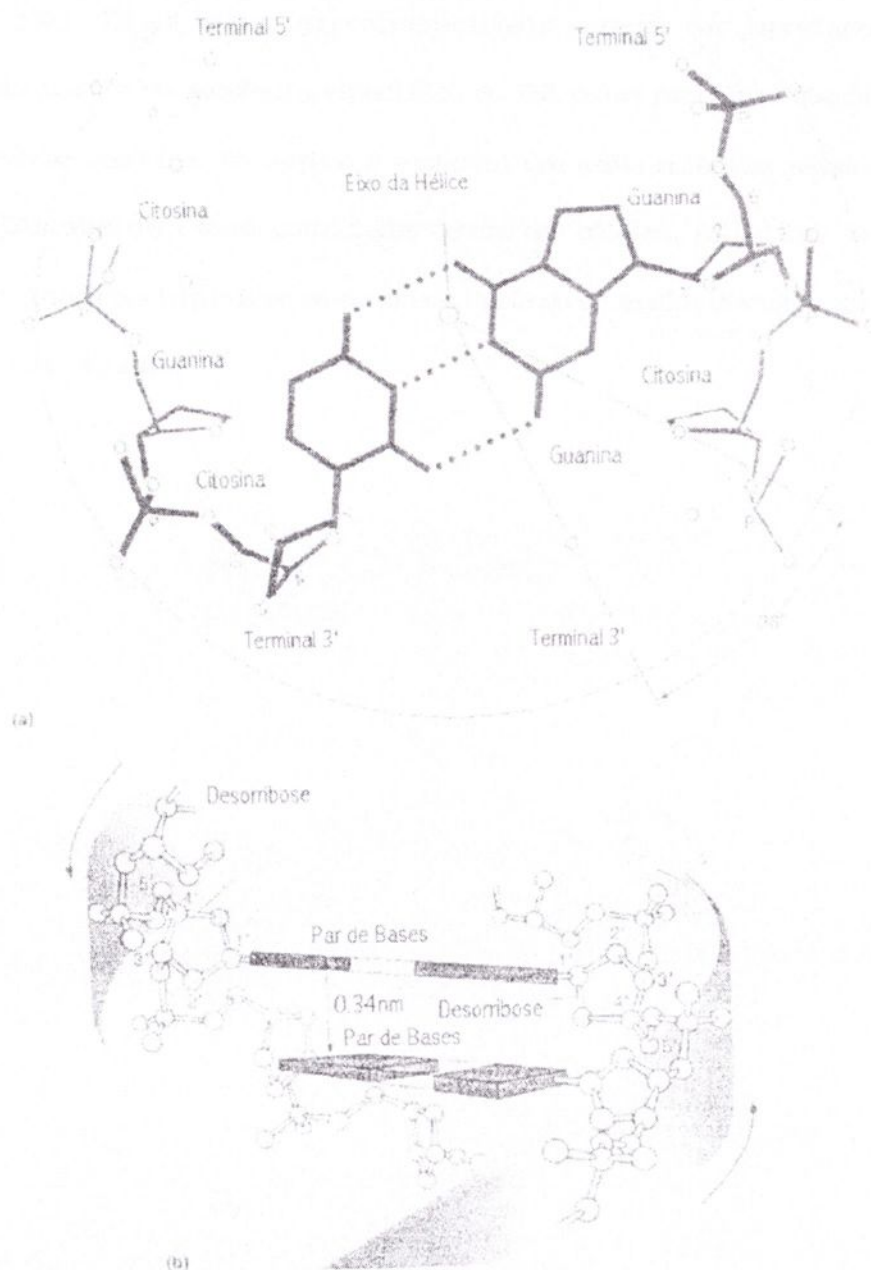


Figura - II – 11: Estrutura fina no B - DNA. (a) Uma vista para baixo ao longo do eixo da hélice, mostrando como os pares de bases se empilham uns sobre outros. O eixo da hélice e rotação de 36° de um par de bases com relação ao próximo estão indicados. (b) Uma vista lateral, ilustrando a simetria da orientação antiparalela das fitas. Também está indicada a elevação de 0.34 nm no eixo.

Pequenas mudanças conformacionais, juntamente com assimetrias na estrutura espacial da pentose e ainda das ligações açúcar - fosfato, contribuem para a formação da estrutura helicoidal e para o aparecimento dos sulcos maior e menor, permitindo que a molécula gigante de DNA se acomode (por múltiplas translações, rotações e torções tanto de bases quanto de pares de bases, interpar e intrapar) em espaços de mínimas dimensões. Essas variações conformacionais parecem ser importantes para o reconhecimento da sequência específica do DNA pelas proteínas que processam a informação genética. Na verdade é essencial que essas moléculas sejam dotadas de flexibilidade para serem compactadas dentro das células. As hélices do DNA podem adotar diferentes tonalidades de curvatura, variando de ângulos discretos até dobras com ângulos agudos.

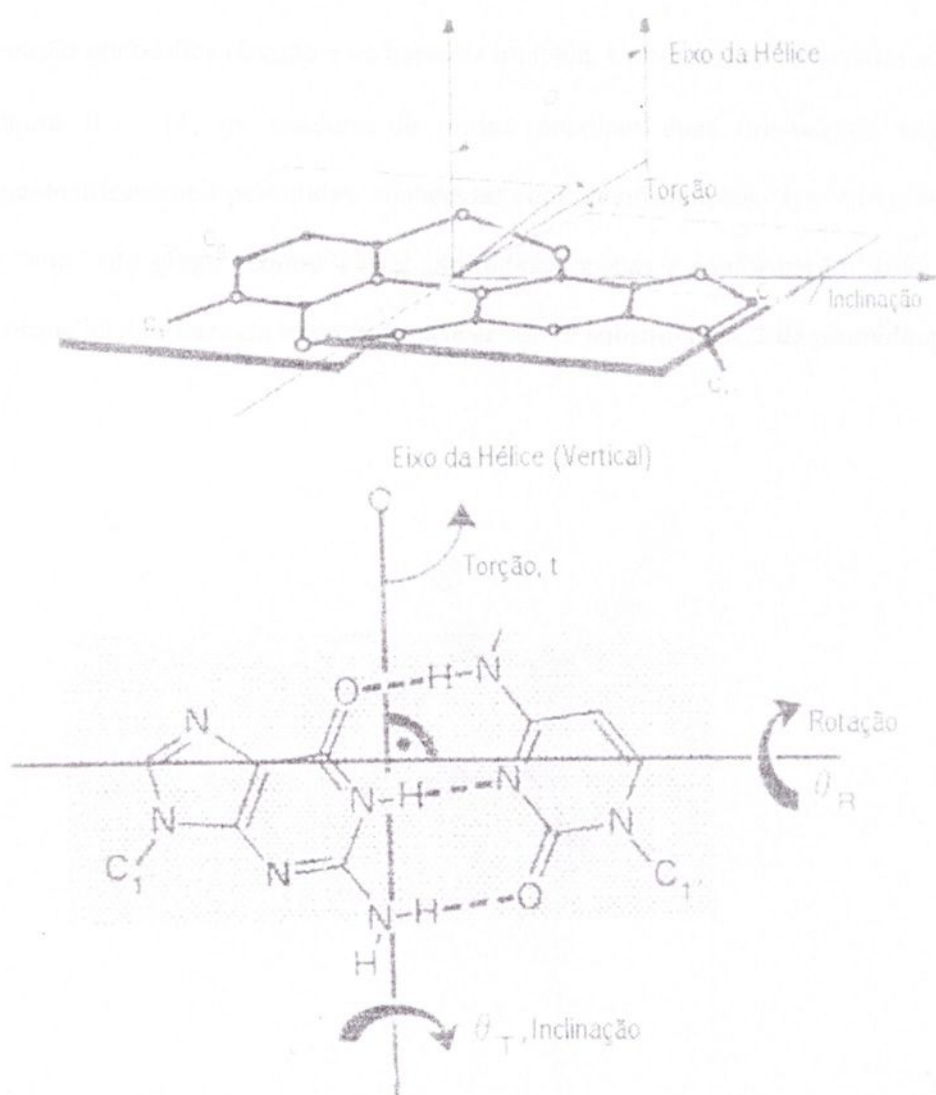


Figura - II - 12: (Em cima) — As duas bases em um par de bases não são exatamente coplanares, mas apresentam uma torção θ_p , definida como ângulo diedral entre planos de bases individuais. Olhando para baixo o longo eixo da hélice, θ_p é definido como positivo se a base próxima é rodada no sentido dos ponteiros do relógio em relação àquela mais distante. (Em baixo) — A orientação de um par de bases em relação ao eixo da hélice é dada pela torção rotacional t , pela inclinação θ_i e pela rotação θ_R .

A conformação de uma unidade nucleotídica como indicado nas figuras II - 13 e 14, é especificada por seis ângulos de torção que descrevem a orientação da base ao redor da ligação glicosídica (a ligação que une C1 à base). Apesar de parecer que os sete graus de liberdade por nucleotídeo poderiam produzir nucleotídeos altamente flexíveis,

esses ângulos de torção estão sujeitos a uma variedade de limitações internas que restringem muito a liberdade rotacional. A rotação de uma base em torno de uma ligação glicosídica (ângulo χ) é bastante limitada. Conforme se observa no esquema da figura II – 14, os resíduos de purina possuem duas orientações estericamente (geometricamente) permitidas, conhecidas como conformações “syn” (do grego “com”) e “anti” (do grego “contra”). Nas pirimidinas apenas a conformação “anti” é estável, porque há interferência estérica do açúcar com o substituinte C2 da pirimidina.

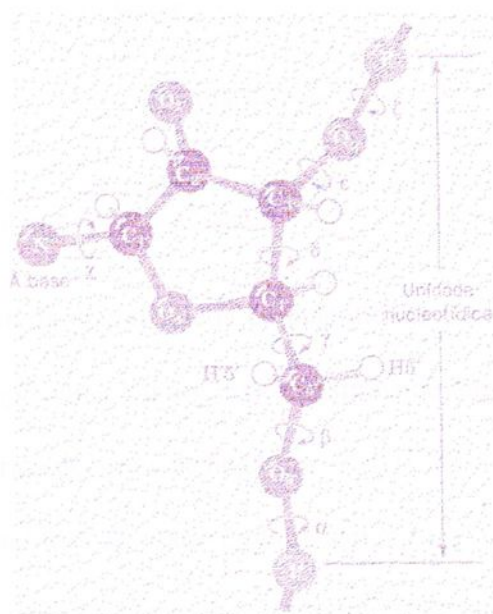


Figura II – 13: Os sete ângulos de torção que determinam a conformação de uma unidade nucleotídica.

Na maioria das duplas hélices de ácidos nucleicos, todas as bases estão na forma anti. A exceção é o Z – DNA, no qual os resíduos alternados de pirimidina e purina são anti e syn, respectivamente.

A flexibilidade do anel de ribose, também é limitada. Os ângulos de um pentágono regular são de 108° , um valor próximo do tetraedro ($109,5^\circ$). Assim, seria de

se esperar que o anel de ribofuranose fosse planar. Entretanto, nessa configuração os átomos se acumulam em congestionamento. Para aliviar esse congestionamento, que acontece mesmo entre átomos de hidrogênio, o anel torna-se ligeiramente, não planar.

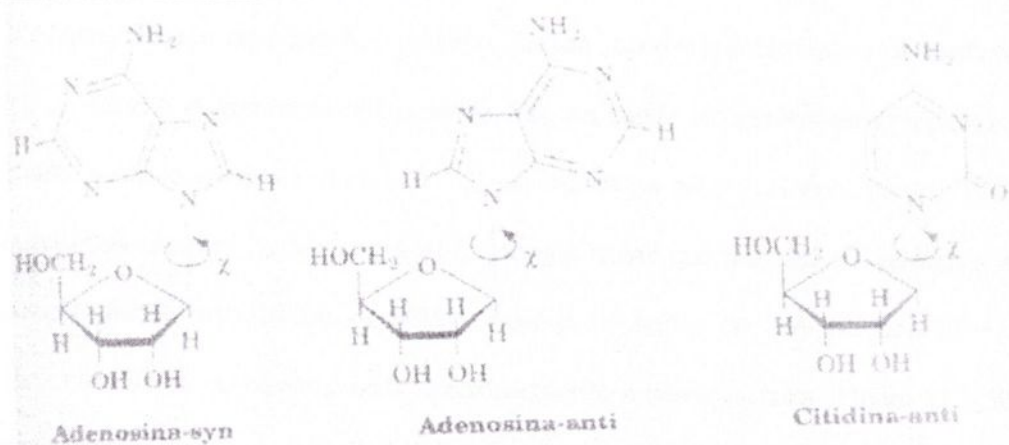


Figura - II - 14: Orientações estericamente permitidas para as bases púricas e pirimidicas, com respeito às unidades de ribose a elas ligadas.

Na grande maioria de nucleosídeos e nucleotídeos conhecida, quatro átomos do anel são considerados coplanares em alguns centésimos de ângstron, e o átomo restante fica fora do plano por vários décimos de ângstron.

No açúcar, o átomo fora do plano é quase sempre C2' ou C3' (figura II - 2). As duas conformações mais comuns são conhecidas como C3' - endo e C2' - endo: "endo" (do grego 'endon', dentro), indica que o átomo fora de lugar está no mesmo lado do anel que C5', de forma mais explícita 'endo' significa que o átomo deslocado ficou situado dentro da região entre os três átomos restantes e o átomo C5'; o deslocamento em direção ao lado oposto a C5' colocará o átomo deslocado fora da região descrita acima, por isso ele é denominado de conformação 'exo' ou "fora de".

Finalmente, se os ângulos de torção da cadeia açúcar - fosfato (ângulos α a ζ na figura II - 13) fossem completamente livres para rodar, muito provavelmente a estrutura dos ácidos nucléicos não seria estável. Contudo, esses ângulos são realmente bastante

restritos e isto se deve a forças de atração e repulsão (dependentes das distribuições das cargas localmente) entre o anel da pentose e os grupos fosfato e, nos polinucleotídeos, devido à interferência espacial entre os resíduos (ver figuras II - 14). O resultado global é que as cadeias de açúcar - fosfato da dupla hélice são rígidas, ainda que os ângulos conformacionais de açúcar - fosfato sejam razoavelmente livres de restrições.

Como o diâmetro da hélice é de $20\text{\AA}$, as bases adjacentes estão separadas por $3.4\text{\AA}$, sendo cada uma rodada por 36° em relação a seus vizinhos, então, 10 bases completam um giro da hélice. Assim, podemos dizer que uma vez que as bases estão parcialmente empilhadas, a hélice possui um passo de $34\text{\AA}$ (Figura II - 11).

Cada par de bases possui aproximadamente a mesma largura (Figura II - 10), o que contribui para uma simetria quase perfeita da molécula de DNA, independente da composição das bases. Os pares A - T e C - G são interconvertíveis, eles podem substituir um ao outro na dupla hélice, sem alterar as posições do átomo $C1'$ do esqueleto açúcar - fosfato.



II-1.8 - A Estrutura secundária do DNA

Difração de Raios - X foi extensivamente usada no estudo da arquitetura molecular do DNA, por diversos pesquisadores. Usando informações obtidas com esta técnica, juntamente com observações químicas, Watson e Crick propuseram a idéia de que a molécula de DNA é constituída por uma dupla fita na forma de uma hélice destra, com as duas cadeias de nucleotídeos enroladas em torno do mesmo eixo e mantidas juntas por ligações de Hidrogênio entre as bases. Fazendo modelos em escala eles foram capazes de mostrar que as bases podiam encaixar ali se elas fossem arranjadas em pares com uma pirimidina em uma fita e uma purina na outra. A equivalência do número de adenina e timina, bem como no de guanina e citosina, (primeiramente observado por Chargaff⁽⁴⁾) sugeria que estas bases aparecessem aos pares desses dois tipos como indicado na figura II - 10.

Os pares de base são planos e podem ser empilhados uns em cima dos outros, como numa pilha de pratos, de tal forma que a molécula é realmente representada como uma escada espiral, com os pares de bases formando os degraus (figuras II - 15).

As duas cadeias de nucleotídeos são de polaridades opostas no sentido que o nucleotídeo terminal de uma fita tem carbono C5' livre, enquanto a fita complementar, tem um terminal 3' livre nos terminos frontais. Isto significa que as duas fitas correm em direções opostas (figuras II - 15).

A notação curta para descrever duas fitas de DNA consiste em escrever a fita de polaridade 5' → 3' na linha de cima da sequência com a fita complementar de polaridade oposta, logo abaixo, por exemplo:

5' - AGGTC - 3'

3' - TCCAG - 5'



Uma consequência importante da configuração do emparelhamento de bases encontrada no DNA é que a ordem na qual as bases ocorrem em uma sequência determina automaticamente a ordem na qual elas ocorrem na cadeia complementar. Além desta condição essencial, não existem restrições sobre a sequência de bases ao longo das cadeias.



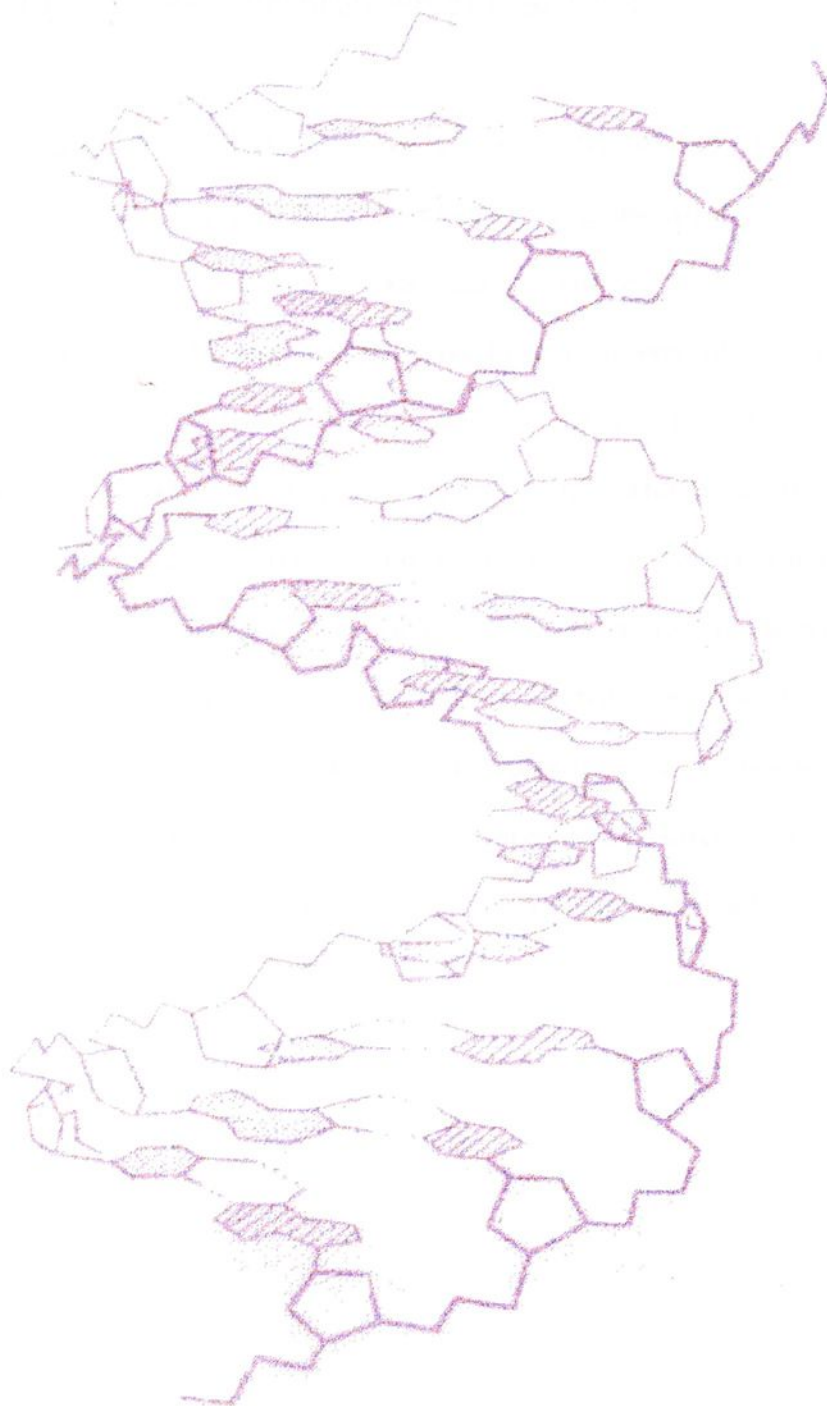


Figura II - 15: A dupla hélice do DNA. A cadeia principal de uma delas está desenhada com traços mais fortes de tal maneira que as duas cadeias podem ser distinguidas.

II-1.9 - Graus de liberdade dos pares de bases

Os graus de liberdade dos pares de base do DNA são melhor visualizados em um sistema de eixos ortogonais, $Oxyz$ de orientação pela mão direita, como indicado na figura II - 12, onde a origem é localizada próximo ao N1 da purina do par sob consideração. O par de bases pode ser considerado como sendo planar e perpendicular ao eixo da hélice. Oz é tomado ao longo deste eixo, Oy vai de C6 (pirimidina) para C8 (purina). De modo que Ox intercepta as ligações de hidrogênio do par (figura II - 16).

Primeiro, a flexibilidade das ligações H possibilitam liberdades rotacionais entre as bases do par como indicado na figura II - 16. Estas rotações não são necessariamente coplanares. Na figura II - 16, os movimentos individuais como <<abertura>>, <<torção helicoidal>> e <<dobra>> correspondem a rotações em torno dos eixos Ox , Oy e Oz , respectivamente. As bases de cada par, também têm liberdades translacionais; <<escalonamento>>, <<estiramento>> e <<cisalhamento>>, também mostrados na figura II - 16.

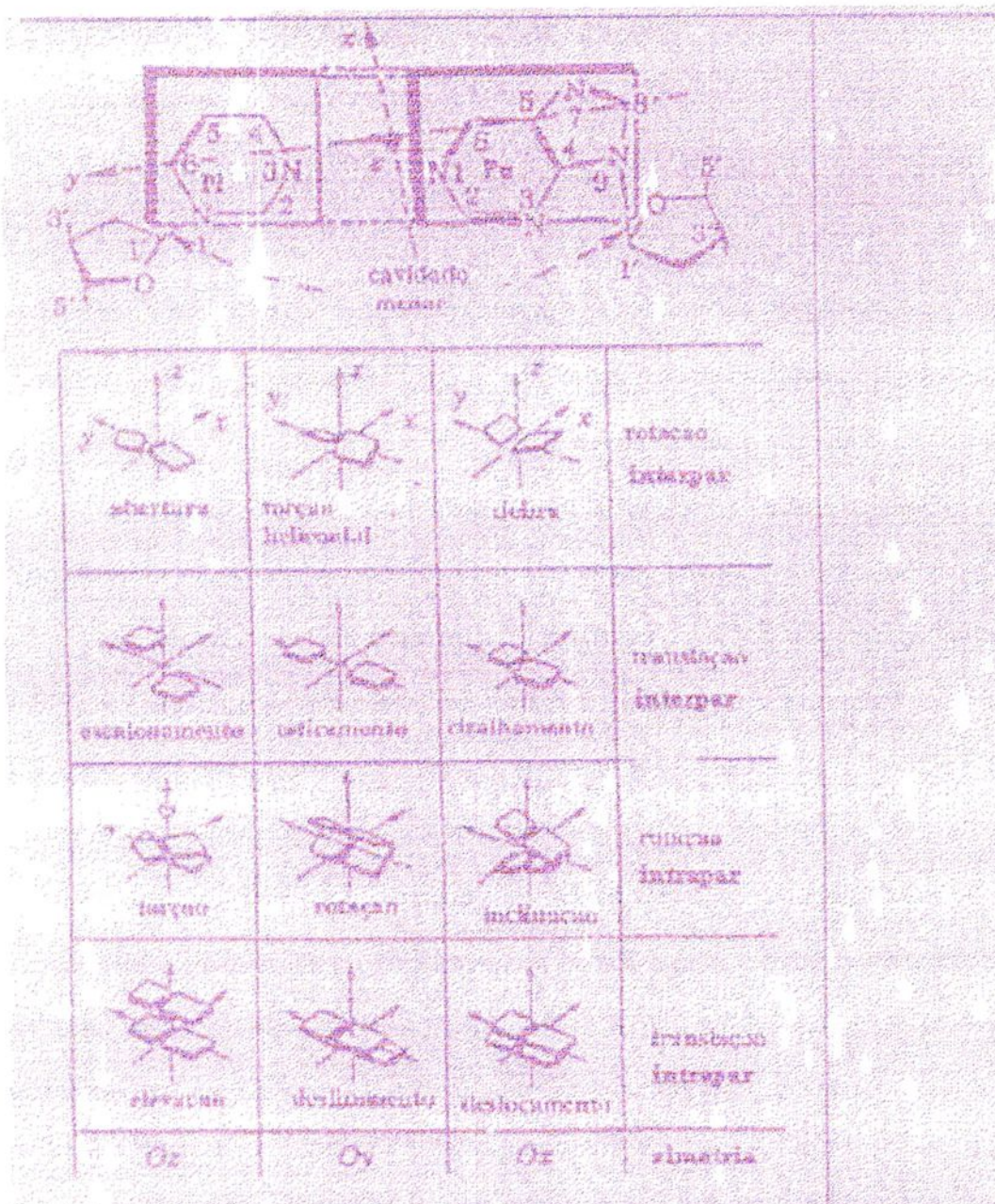


Figura II - 16: Purinas e pirimidinas estão esquematizadas como retângulos; maior e menor respectivamente. Também são mostrados os principais graus de liberdade: rotacionais e translacionais, intra e inter pares de base, bem como seus nomes.

II-2 - FORÇAS QUE ESTABILIZAM O DNA

II-2.1 - Introdução

Após a descrição dos aspectos estruturais pertinentes aos ácidos nucleicos, com destaque ao DNA, consideramos agora as forças que mantêm essas estruturas.

As interações fundamentais a serem estudadas são aquelas entre as bases. Estas interações estão divididas em dois tipos, as no plano das bases, devidas às ligações de Hidrogênio, e as perpendiculares ao plano das bases, chamadas de empilhamento de bases, estabilizadas, principalmente, pelas forças de van der Waals, dispersão de London e efeitos hidrofóbicos. Ambas são individualmente acessíveis a mensuramentos e têm sido objeto de investigações detalhadas⁶. Destacam-se às ligações de Hidrogênio que exercem papel importante no que se refere ao código genético⁽⁵⁾.

Os grupos fosfatos são carregados negativamente, isto deveria ocasionar uma grande repulsão eletrostática. Entretanto, em solução aquosa, a blindagem ocasionada por íons positivos é bastante intensa o que possibilita negligenciar interações de longo alcance de natureza eletrostática, no estudo do DNA.

II-2.1.1 - Desnaturação

Quando uma solução contendo DNA é aquecida acima de uma temperatura característica sua estrutura nativa entra em colapso, as duas fitas complementares separam-se e assumem uma conformação aleatória de cadeias simples (Figura II-17).



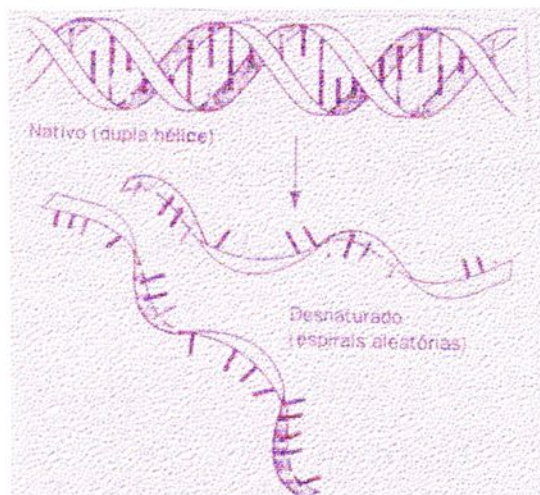


Figura II - 17: Uma representação esquemática da desnaturação do DNA.

Esse processo de desnaturação é acompanhado por uma mudança qualitativa nas propriedades físicas do DNA. Por exemplo, a alta viscosidade de soluções de DNA nativo, oriunda da resistência à deformação das moléculas rígidas e da forma cilíndrica da dupla hélice, diminui drasticamente quando o DNA se decompõe em fitas simples de conformação flexível. Do mesmo modo, a absorbância (uma das técnicas de monitoramento utilizadas) do DNA na região ultravioleta, que é praticamente devida às bases aromáticas, aumenta ~ 40% na desnaturação (Figura II - 18) em consequência da ruptura das interações eletrônicas entre bases vizinhas.

O monitoramento das mudanças na absorbância em um único comprimento de onda (normalmente 2600Å) com o aumento progressivo da temperatura revela que o aumento na absorbância ocorre em uma faixa estreita de temperatura (Figura II - 19). Isso indica que a desnaturação do DNA é um fenômeno cooperativo no qual o colapso de uma parte da estrutura desestabiliza o restante. Em analogia com a fusão de um sólido, a figura II - 19 é denominada curva de desnaturação, e a temperatura no ponto

médio é definida como temperatura de desnaturação, T_d ou ainda T_m do inglês 'melting'.

A estabilidade da dupla hélice de DNA e, portanto sua T_d , depende de uma série de fatores, incluindo a natureza do solvente, as identidades e concentrações dos íons na solução e o pH.

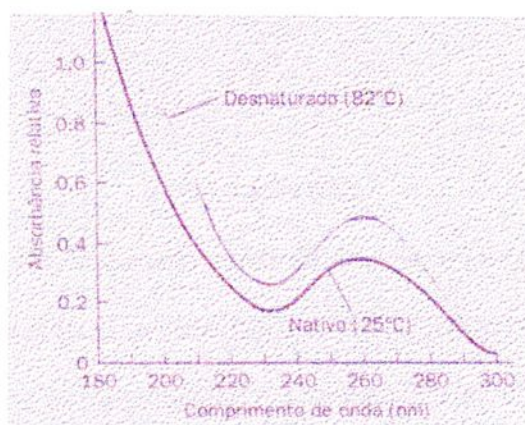


Figura II - 18: O espectro de absorvância ao UV do DNA de *E. coli* nativo e desnaturado pelo calor. Observe que a desnaturação não muda o aspecto geral da curva de absorvância, mas apenas aumenta sua intensidade.

II-2.2 - Caracterização das ligações de Hidrogênio

Dentre os diversos tipos de ligações químicas existentes na natureza, estamos agora particularmente interessados nas ligações de Hidrogênio, ou pontes de Hidrogênio, como se convencionou chamar. Estas ligações desempenham um papel fundamental na estabilização da estrutura secundária dos ácidos nucleicos e tem caráter prioritariamente eletrostático.

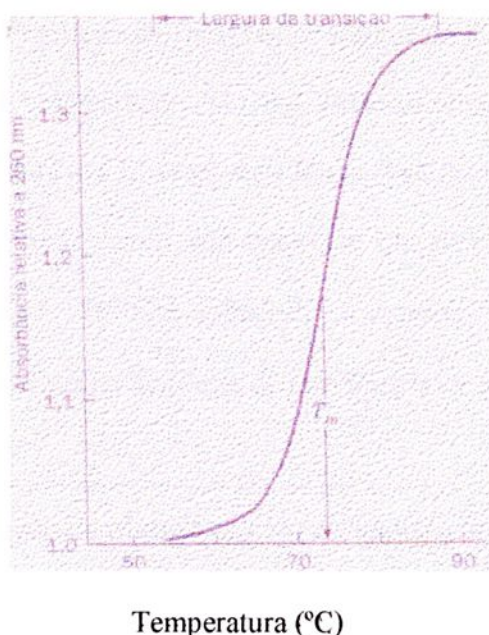


Figura II – 19: Um exemplo de uma curva de desnaturação do DNA. A absorbância relativa e a razão da absorbância (normalmente medida a 2600Å) na temperatura indicada e a 25°C. A temperatura de desnaturação é a temperatura na qual metade do aumento máximo da absorbância é alcançada.

Em geral, uma ligação de Hidrogênio é formada se um átomo de hidrogênio (H) conecta dois átomos X e Y, de eletronegatividades mais elevadas, esquematicamente:



O comprimento da ligação é efetivamente dado pela distância entre os átomos X e Y, o átomo H faz a conexão entre X e Y (como uma ponte), daí a origem do nome desta ligação.

Como as ligações de Hidrogênio, são essencialmente eletrostáticas em sua natureza, sua intensidade (refletida no comprimento da distância H.....Y) depende das cargas parciais, localizadas em X, H e Y. Interações de pontes de Hidrogênio entre bases no DNA são do tipo $N - H \cdots N$, $N - H \cdots O$.

Elas são “moles” (maleáveis, flexíveis), e sutilmente direcionais. Comparadas com ligações covalentes, com comprimento, intensidade e orientação bem definidas; as ligações de Hidrogênio são 20 a 30 vezes mais fracas (Tabela II-3). Por esta razão, elas são mais suscetíveis a torções e/ou estiramentos, e isto resulta em geometrias mais variáveis para o sistema $X - H \cdots Y$, a Tabela II - 4 apresenta as distâncias e ângulos característicos entre os átomos participantes de uma ligação de hidrogênio.

Tabela II - 3: Comparação de alguns valores de energia em ligações Covalentes e de H

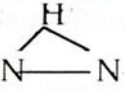
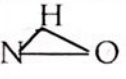
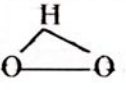
Tipo de ligação covalente	Comprimento em Å	Energia em kcal/mol	Energia p/estirar de 0,1 Å (kcal/mol)
C - C	$1,54 \pm 0,02$	83,1	3,25
C - H (no etano)	$1,09 \pm 0,02$	98,8	3,60
Ligação de H O - H ... O	$2,75 \pm 0,2$	3 → 6	0,1

Sob a influência de uma ligação de Hidrogênio, as cargas sobre os átomos envolvidos são modificadas devido à polarização, sendo que o H torna-se mais eletropositivo e X, Y tornam-se mais eletronegativos. Este efeito conduz a um aumento nas afinidades de X e Y, para aceitar mais ligações de Hidrogênio. Se Y é o átomo de Oxigênio, de um grupo Hidroxila, o Hidrogênio agregado a ele também será afetado pela polarização, tornando-se um melhor doador. Uma vez que esta cooperatividade mantém - se em geral para sistemas bifuncionais $X \cdots H \cdots X \cdots H \cdots$; onde cada doador desempenha simultaneamente o papel de acceptor e vice - versa, isto pode

envolver hidroxilas de nucleosídeos, bem como bases considerando que estas mostram formalmente uma estrutura análoga.

Tabela II - 4: Algumas características geométricas de ligações de Hidrogênio envolvidas em interações base - base.

Distâncias ou ângulos

Sistema	Mínima	Máxima	Média
N – H ··· N			
N ··· N	2,75	3,15	2,90
N – H	0,86	1,02	0,95
H ··· N	1,78	2,02	1,99
	2°	17°	9°
N – H ··· O			
N ··· O	2,74	3,07	2,95
N – H	0,83	1,06	0,95
H ··· O	1,83	2,17	1,95
	3°	23°	9°
O – H ··· O			
O ··· O	2,60	3,05	2,73
O – H	0,68	1,16	0,86
H ··· O	1,74	2,20	1,95
	1°	20°	8°

II-2.3 – Interações entre átomos não Ligados

De modo geral, existem interações que ocorrem entre todas as moléculas e entre todas as partes das moléculas. Interações intramoleculares ocorrem entre partes da mesma molécula; interações intermoleculares ocorrem entre duas moléculas diferentes. As forças podem ser atrativas ou repulsivas dependendo das propriedades dos grupos e das distâncias entre os grupos interagentes^(5,6).

Todos os átomos e moléculas se repelem a distâncias muito curtas. A energia de dois átomos aumenta muito rapidamente se eles são comprimidos dentro de um mesmo espaço. A repulsão pode ser calculada usando a mecânica quântica; isto provém do fato de não podermos colocar mais do que dois elétrons em um orbital eletrônico. A repulsão aumenta de forma aproximadamente exponencial em curtas distâncias. Por conveniência matemática, têm-se usado modelos simples de repulsão por superposição eletrônica. O modelo mais simples de estrutura molecular para átomos é conhecido como modelo de esferas rígidas. Dois átomos são considerados como tendo energia de interação ‘zero’ até que entrem em contato a distância de esfera rígida; a energia de interação então vai subitamente para infinito. Esta é a figuração que serve como uma base para modelos de preenchimento do espaço que são projetados para dar um sentido para o tamanho e forma da molécula.

Uma aproximação melhor é a de uma repulsão que depende do inverso da décima segunda potência da distância; assim o escape ocorre muito rapidamente, mas não tanto quanto no modelo da esfera rígida. A repulsão entre dois átomos quaisquer é representada como:

$$U(r) = B_{ij}/r_{ij}^{12}. \quad (H-1)$$



A distância entre os átomos i e j é representada por r_{ij} . A constante B_{ij} é positiva e dependente de ambos os átomos. Sua unidade deve ser energia vezes distância elevada a 12ª potência.

A figura II – 20, mostra a energia potencial de repulsão entre dois átomos de Oxigênio em duas moléculas de água. A energia de interação é essencialmente zero até a distância entre os átomos ser igual a $3\text{\AA}$; e então a energia cresce rapidamente. Recordando que a força é o negativo da inclinação do gráfico, de energia vs distância, podemos ver na figura II – 20 que a força repulsiva, aumenta rapidamente para distâncias menores que $3\text{\AA}$. A repulsão pode ser entre dois átomos em uma molécula (repulsão intramolecular) ou entre dois átomos em duas moléculas diferentes (repulsão intermolecular). Esta repulsão universal entre dois átomos ou duas moléculas a distâncias curtas é chamada repulsão de van der Waals em homenagem ao cientista holandês que a investigou experimentalmente. O raio de van der Waals é determinado da distância entre dois átomos, onde a energia de repulsão começa a crescer rapidamente. Para dois átomos de Oxigênio a energia de repulsão começa a aumentar rapidamente em cerca de $3\text{\AA}$, portanto o raio de van der Waals para o Oxigênio é aproximadamente $1.5\text{\AA}$. Uma maneira de detectar ligações de hidrogênio entre dois átomos é testar se a distância entre os átomos eletronegativos é menor que a soma de seus raios de van der Waals. Se dois átomos de oxigênio, ou dois átomos de nitrogênio, ou, ainda, um átomo de nitrogênio e um de oxigênio estão distantes $2.8\text{\AA}$, aproximadamente, um do outro então, provavelmente, eles estão sempre ligados por ponte de Hidrogênio.



grafico U em kJ/mol

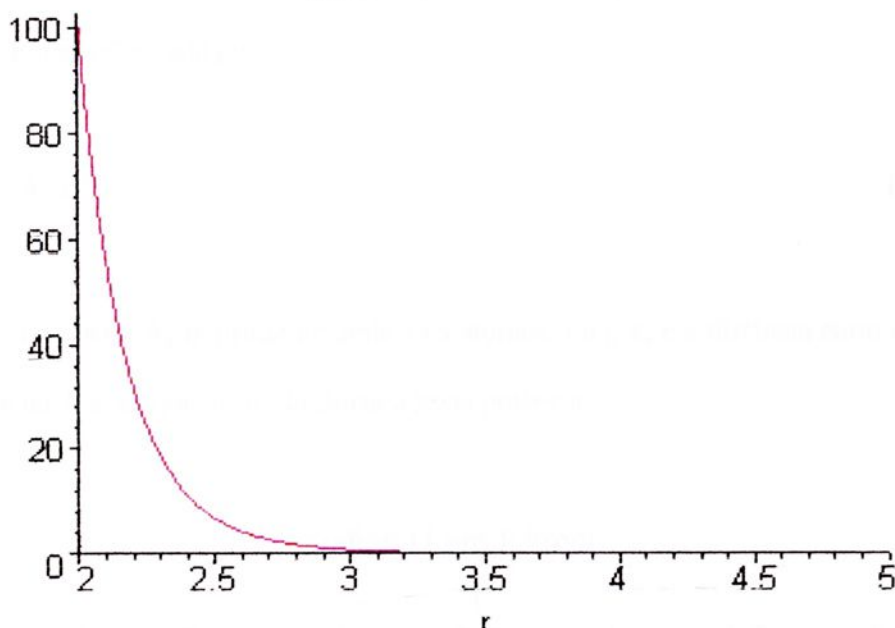


Figura II - 20: Energia potencial repulsiva de interação de dois átomos. Equação (1) é usada com $B_{ij} = 412800 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{12}$, r está em $\text{\AA}$.

Por outro lado, todos os átomos se atraem uns aos outros mesmo se forem eletricamente neutros. Esta atração é causada por flutuações da nuvem eletrônica. Um dipolo instantâneo ocorre em um átomo que induz um dipolo opostamente dirigido em um átomo vizinho. Esta energia de interação devida a flutuações dipolo induzido - dipolo induzido sempre se torna mais negativa quando a distância entre os átomos diminui; a força é sempre atrativa. A energia depende do inverso da sexta potência da distância entre os dois átomos. Esta interação é chamada atração de London, devido a Fritz London que derivou a equação explicando os efeitos. A teoria é puramente mecânico-quântica; não existe análoga clássica. A magnitude da interação é proporcional à polarizabilidade de cada um dos grupos envolvidos. A polarizabilidade pode ser pensada como uma medida da mobilidade ou facilidade de movimentação dos elétrons em uma molécula. A energia de atração de London entre dois átomos de

Oxigênio em duas moléculas de água está mostrada na figura II – 21. A expressão da energia potencial é dada por

$$U(r) = - A_{ij}/r_{ij}^6 \quad (\text{II-2})$$

onde a constante A_{ij} depende de ambos os átomos, i e j , r_{ij} é a distância entre eles e a unidade de A é energia vezes distância a sexta potência.

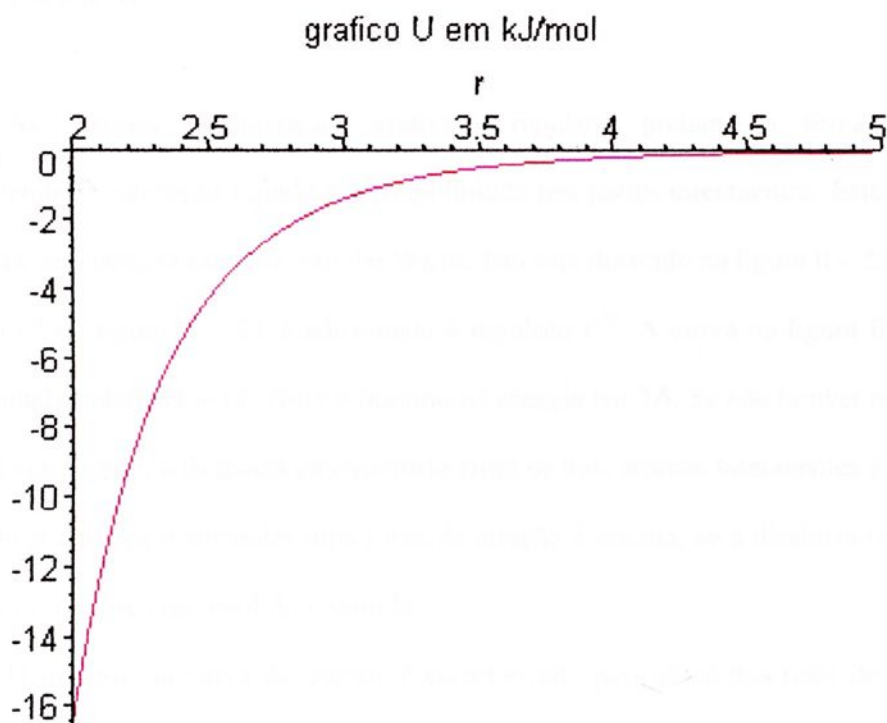


Figura II – 21: A flutuação da atração dipolo-dipolo induzido de London.

Equação (2) é usada com $A_{ij} = 1046 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^6$, r está em $\text{\AA}$.

Tabela II – 5: Parâmetros A_{ij} e B_{ij} para a energia de interação London-van der Waals entre átomos em moléculas. Estes valores dependerão das ligações à volta de cada átomo. A energia de interação é calculada das equações (1) e (2). A última fila fornece a soma dos raios de van der Waals para os átomos.

	H...H	O...O	C...C	O...H	C...H	C...O
A_{ij} (kJ·mol ⁻¹ ·Å)	222	1048	1796	440	613	1348
B_{ij} (kJ·mol ⁻¹ ·Å)	21300	413500	1387000	89200	182300	751400
Soma dos raios de van der Waals (Å)	2,40	3,04	3,40	2,72	2,90	3,22

As energias de interação atrativa e repulsiva podem ser somadas para compreender a interação líquida e a força líquida nas partes interagentes. Esta soma é chamada de interação London–van der Waals. Isto está ilustrado na figura II – 22 onde a atração r^{-6} da figura II – 21 é adicionada à repulsão r^{-12} . A curva na figura II – 22 é denominada potencial 6-12. Note o mínimo na energia em 3 Å. Se não houver nenhuma outra força agindo, a distância de equilíbrio entre os dois átomos interagentes é 3 Å. Se a distância começa a aumentar uma força de atração é sentida, se a distância começa a diminuir uma força de repulsão é sentida.

O mínimo na curva de energia é caracterizado pela soma dos raios de van der Waals dos átomos. Este é o valor de máxima aproximação dos átomos, a não ser que hajam outras forças atuando sobre eles.

A curva da figura II – 22 também é conhecida pelo nome de curva de Lennard-Jones, mesmo nome dado também à equação resultante da soma de (1) com (2). Valores das constantes A_{ij} e B_{ij} para diferentes pares de átomos são mostrados na tabela II – 5.



grafico U em kJ/mol

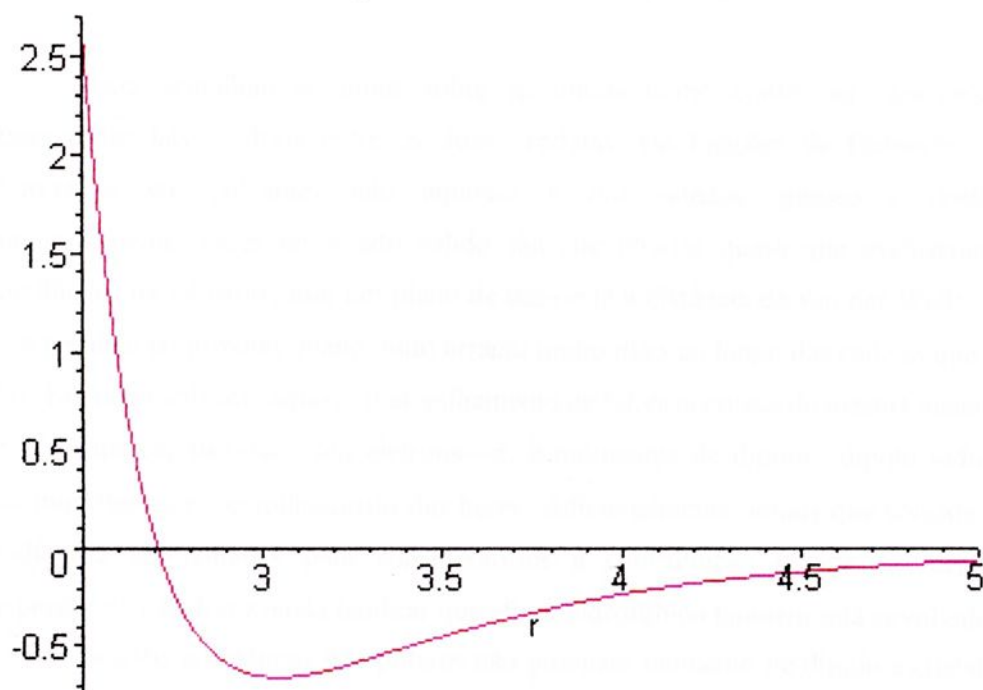


Figura II - 22: A energia de interação London-van der Waals (Lennard-Jones) de dois átomos de Oxigênio, em duas moléculas de água. A curva é $U = B/r^{12} - A/r^6$; é um potencial do tipo 6-12. r está dada em Å.

II-2.4 - Interações: Base—Base ao longo da cadeia.

Bases empilham-se umas sobre as outras como contas em um colar^(3,6). Associações base – base entre as duas cadeias, via ligações de Hidrogênio, são observadas em solventes não aquosos e nos estados: gasoso e cristalino. Adicionalmente, bases no estado sólido são encontradas quase que exclusivamente empilhadas de tal forma que um plano de base está à distância de van der Waals, ~ 3.4 Å, e paralelo ao próximo plano, num arranjo muito mais ao longo das cadeias que entre elas. Em meio solvente aquoso o empilhamento de bases acontece da mesma maneira.

Dipolos, sistemas com elétrons— π , e momentos de dipolo—dipolo induzido, são importantes no empilhamento das bases. Adicionalmente, temos que considerar as evidências apresentadas para considerarmos a contribuição devida às forças de dispersão de London e ainda lembrar que efeito hidrofóbico também está envolvido.

Os anéis aromáticos não polares não possuem momento de dipolo e cristalizam em uma arrumação ao longo do eixo vertical com moléculas adjacentes mais perpendiculares entre si do que paralelas. Se, porém, um nitrogênio for introduzido em uma delas, para criar um momento de dipolo, as moléculas orientam-se paralelamente umas às outras e formam longas pilhas.

Os modelos de empilhamento nas estruturas cristalinas de bases, nucleosídeos e nucleotídeos sugerem que forças entre dipolos permanentes são apenas de importância menor para a estabilização das pilhas de bases. Antes, parece que as interações dipolo—dipolo induzido desempenham o papel principal, com o dipolo permanente, predominantemente no C=O ou nos grupos C—NH₂, superposto sobre o sistema aromático da base adjacente.

O empilhamento vertical de bases vai muito além do estado dimérico⁽⁶⁾ (Figura II – 23). Experimentos cuidadosos de sedimentação mostraram que o processo é reversível com um incremento constante de energia livre para cada passo sugerindo que a adição de uma base a uma outra ou a uma pilha existente é aditiva e não cooperativa e assim segue um comportamento isodésmico (cada passo é independente e mostra os mesmos parâmetros cinéticos e termodinâmicos). As bases são ligadas umas às outras em oligo e polinucleotídeos, isto provoca interações de empilhamento entre bases adjacentes dando origem a estruturas estáveis, de fita única ou estruturas helicoidais. A estabilidade destas hélices é afetada por sua estrutura, com poli (A) sendo

principalmente helicoidais e poli (U) mostrando predominância de espiras aleatórias à temperatura ambiente.

Na maioria dos casos as formações seguem um mecanismo com duas configurações, a saber, helicoidal (empilhado) e espiras aleatórias (não empilhado).

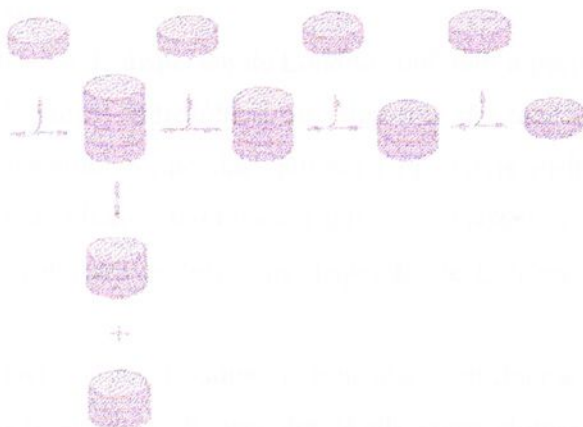


Figura II - 23: Empilhamento de bases em meio solvente aquoso vai além do estado dimérico e segue comportamento isodésmico em amplo sentido; i.e. cada passo é independente e mostra os mesmos parâmetros cinéticos e termodinâmicos⁽⁶⁾.

II-2.5 - Interações Hidrofóbicas e Dispersão de London

O empilhamento de bases é estabilizado por contribuições entrópicas: icebergs e cavidades na água. Se uma base é dissolvida na água, as moléculas individuais de soluto tendem a agregar-se e reduzir o número de contatos soluto – solvente; atingindo em alguns casos um sistema de duas fases. Este efeito hidrofóbico é de particular interesse em macromoléculas biológicas porque contribui para a estabilização das estruturas secundária e terciária dos ácidos nucleicos.

Embora largamente aceito em amplo sentido, o efeito hidrofóbico é ainda matéria de debates. As agregações de moléculas de soluto em água têm sido explicadas de duas maneiras: a primeira delas observa que se uma molécula hidrofóbica ou não polar é dissolvida em água, moléculas de água aglomeram-se em volta de sua superfície. Elas adotam uma estrutura ‘tipo Iceberg’ e perdem entropia. Por outro lado, se as moléculas de soluto se agregam, sua superfície exposta à água é diminuída e moléculas

estruturadas de água são liberadas, resultando em um ganho total de entropia para a água, o que estabiliza o complexo soluto. Outra explicação estabelece que para uma molécula do soluto adentrar a água ele deve criar uma cavidade contra a tensão superficial da água. Se duas ou mais moléculas de soluto agregarem, grandes cavidades são formadas e a superfície diminuída, levando à redução da tensão superficial o que promove este processo.

Forças dipolares e de dispersão de London conferem especificidade ao processo de empilhamento. As forças hidrofóbicas sozinhas não são capazes de explicar certos efeitos, como por exemplo, o fato das purinas empilharem melhor que pirimidinas. Essas propriedades individuais estão relacionadas com os sistemas eletrônicos das bases e são devidas principalmente às forças de dispersão de London e a interações entre dipolos.

Como reconhecido por London, a principal contribuição para a efetividade continuada das forças atrativas de van der Waals entre átomos em contato muito próximo reside em interações eletro – cinéticas entre os sistemas. Em qualquer instante, a distribuição de carga eletrônica no interior de grupos atômicos é assimétrica devido a flutuações das nuvens eletrônicas. Portanto, dipolos criados em um grupo de átomos, polarizam o sistema eletrônico dos átomos ou moléculas vizinhos, induzindo assim dipolos paralelos os quais atraem um ao outro. Essas forças são aditivas e diminuem com a sexta potência da distância. Elas são independentes da temperatura e aumentam com o produto das polarizabilidades parceiras. Quando as bases possuem, em adição, um momento de dipolo permanente, os dois efeitos eletrônicos, dispersão de London e dipolos permanentes, se combinam para produzir efeitos apreciáveis, os quais são mais pronunciados nas bases purinas, que nas pirimidinas.

Ligações de Hidrogênio em pares de bases dependem apenas da sua composição enquanto que empilhamento é influenciado por composição e sequência.



Tabela II - 6: Energias de empilhamento total [kcal/mol·dímero] para os dez possíveis dímeros no arranjo tipo B - DNA obtidas por cálculos da Química Quântica⁽⁶⁾.

Empilhamento de Dímeros **Energias de Empilhamento kcal/mol* dímero**

[C-G]		14.79
[G-C]		
[C-G] [T-A]		10.91
[A-T] [G-C]		
[C-G] [A-T]		9.81
[T-A] [G-C]		
[G-C]		9.69
[C-G]		
[G-C] [C-G]		8.30
[G-C] [C-G]		
[T-A]		6.57
[A-T]		
[G-C] [A-T]		6.57
[T-A] [C-G]		
[G-C] [T-A]		6.78
[T-A] [C-G]		
[A-T] [T-A]		5.41
[A-T] [T-A]		
[A-T]		5.82
[T-A]		

a-Setas designam direção das cadeias de açúcar - fosfato e apontam de C3' de uma unidade açúcar para C5' da próxima, ambos os Carbonos atrelados à mesma ligação fosfodiéster.

A equação de London pode ser escrita considerando as relações de van der Waals e Lennard - Jones. A relação para a interação de dispersão de energia em dois átomos ou moléculas, idênticos é dada por,

$$W(r) = -C_{\text{disp}}/r^6 \quad (\text{II-3})$$

Se considerarmos as moléculas como esferas rígidas e com diâmetro σ , sendo que a interação entre o par de moléculas é dada por London, a constante C é dada por:

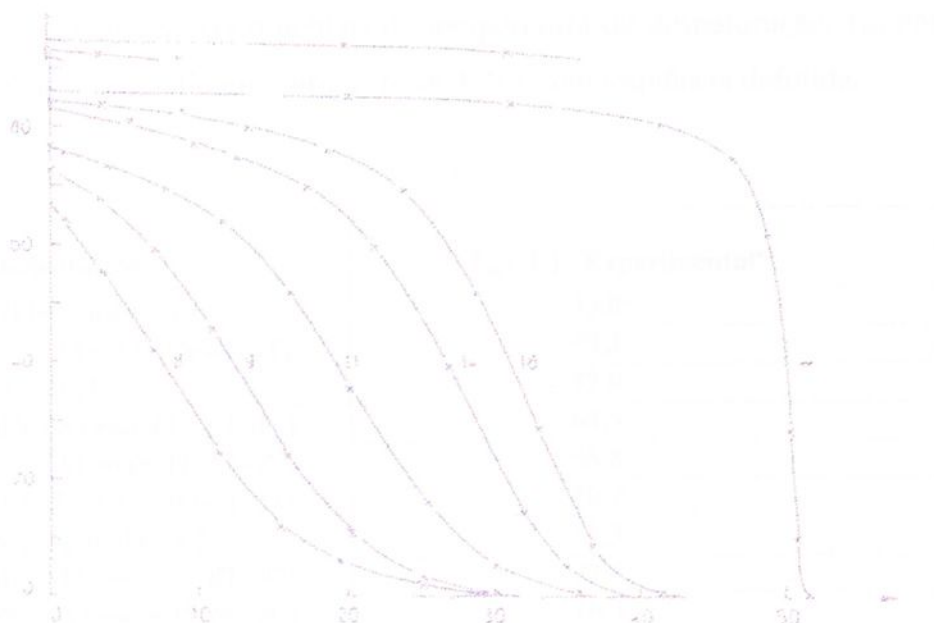
$C = 9ab/(4\pi^2 N_0^3) = 1.05 \cdot 10^{-76} ab$; onde a (dado em $\text{dm}^6 \text{atm} \cdot \text{mol}^{-2}$) e b (dado em $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) são as constantes que aparecem na equação de estado de van der Waals (Apêndice A – I, equação A-2, página 73) e N_0 é o número de Avogadro.

II-2.5 – Formação e Ruptura da Estrutura da Dupla Hélice Mostra Comportamento Cooperativo

Uma hélice com o passo como motivo repetitivo básico pode ser considerada como se fosse um retículo cristalino unidimensional. Uma analogia formal da ordem helicoidal e cristalina é refletida em propriedades físicas: Ambas se rompem subitamente em uma certa temperatura (fusão ou desnaturação) e ambas crescem e se propagam depois de um núcleo (semente) ter sido formado.

Temperatura de desnaturação, T_m , é uma das grandezas que caracterizam uma dupla hélice. O empilhamento de bases é acompanhado pela redução na absorção UV (hipocromicidade) de forma que o espectro é um monitor eficiente na formação e ruptura (desnaturação) da dupla hélice. Se a temperatura de uma solução contendo dupla hélice de DNA (ou RNA) for lentamente elevada, a absorção UV aumenta subitamente em uma certa temperatura porque a ordenada dupla hélice se dissociou, ou desnaturou. O ponto médio da transição é chamado temperatura de desnaturação T_m . Esse valor corresponde a 50% de transição. A figura (II – 24) ilustra o processo de desnaturação. No caso da figura apresentada essa propriedade refere-se ao RNA. Resultado semelhante é obtido para o DNA. Na situação destacada na legenda da figura, nota-se na temperatura ($49^\circ\text{C} = 322\text{K}$) uma variação abrupta na absorbância U.V., indicando a ruptura da molécula nessas condições na temperatura $T \equiv T_m$ correspondente ao ponto no qual nitidamente inicia-se a brusca mudança estrutural.





Absorbância (eixo vertical), Temperatura (°C)(eixo horizontal)

Figura II - 24: Perfil de desnaturação de transição cooperativa hélice $\leftrightarrow$ cadeia aleatória, em duplas hélices oligo (A) oligo (U) para vários comprimentos de cadeias, de 8 a ∞ nucleotídeos. No caso da nossa figura T_m está por volta de $49^\circ\text{C} = 322\text{K}$. As curvas representam as variações na absorção do ultravioleta de 290nm na forma de efeitos hipercrômicos (eixo vertical) definidos como: $100 \cdot (E_c - E_T)/(E_c - E_0)$, onde E_T = absorção na temperatura T (eixo horizontal), E_c = absorção com 100% na forma aleatória e E_0 é a absorção quando o DNA está intacto. As concentrações estão entre 5 e 11,3 mM oligonucleotídeos, 50mM de solução de NaCl na forma tamponada em pH 6.9⁽⁶⁾.

Tabela II – 7: Valores experimentais da temperatura de desnaturação, T_m , em graus Celsius, para polímeros sintéticos de DNA com sequência definida.

Polinucleotídeos	T_m (°C) Experimental ^a
Poli(dA-dT)•poli(dA-dT)	45,0
Poli(dA-dA-dT) •poli(dA-dT-dT)	49,2
Poli(dA) •poli(dT)	53,0
Poli(dG-dA-dA) •poli(dT-dT-dC)	64,5
Poli(dG-dT-dA) •poli(dT-dA-dC)	66,8
Poli(dA-dA-dC) •poli(dG-dT-dT)	70,2
Poli(dG-dA) •poli(dT-dC)	71,3
Poli(dG-dA-dT) •poli(dA-dT-dC)	72,0
Poli(dG-dG-dA) •poli(dT-dC-dC)	76,3
Poli(dG-dT) •poli(dA-dC)	77,4
Poli(dG) •poli(dC)	87,8
Poli(dG-dC) •poli(dG-dC)	99,2

^a A temperatura de fusão (desnaturação) T_m a várias intensidades iônicas foram interpoladas para 19,4 mM $\text{Na}^{+(5,6)}$.

Na Tabela II – 7 estão apresentados os resultados experimentais para a temperatura de desnaturação para várias sequências da dupla fita em condições experimentais padrão^(5,6).

III - MODELO VIBRACIONAL

III. 1 - Descrição do Modelo

O processo geral da dinâmica interna do DNA é bastante complexo. Entretanto, é possível escolher modelos simplificados que permitam analisar propriedades específicas. Nestes casos, a geometria do modelo é fundamental. O modelo de Barkley e Zimm⁽⁸⁾; é o mais simples deles, a molécula de DNA é um bastão (ou fita) longo, homogêneo e elástico (figura - 1a), cuja forma corresponde à imagem que pode ser vistas em microfotografias eletrônicas. Este modelo sugere apenas dois movimentos dominantes, rotação e torção do cilindro em torno do seu eixo. Assim, muitos movimentos e estruturas internas do DNA, não são considerados.

Para melhorar a descrição da dinâmica do DNA, foi proposto outro modelo, consistindo de dois bastões elásticos, longos e fracamente interagentes, que estão enrolados um no outro para produzir a dupla - hélice (figura - 1b)⁽²⁾. Cada fita, simula uma, das duas cadeias de polinucleotídeos da molécula de DNA. O modelo proposto assume uma posição intermediária entre o modelo de Barkley e Zimm e o modelo mais próximo do exato (figura 1c), usado em simulações computacionais.



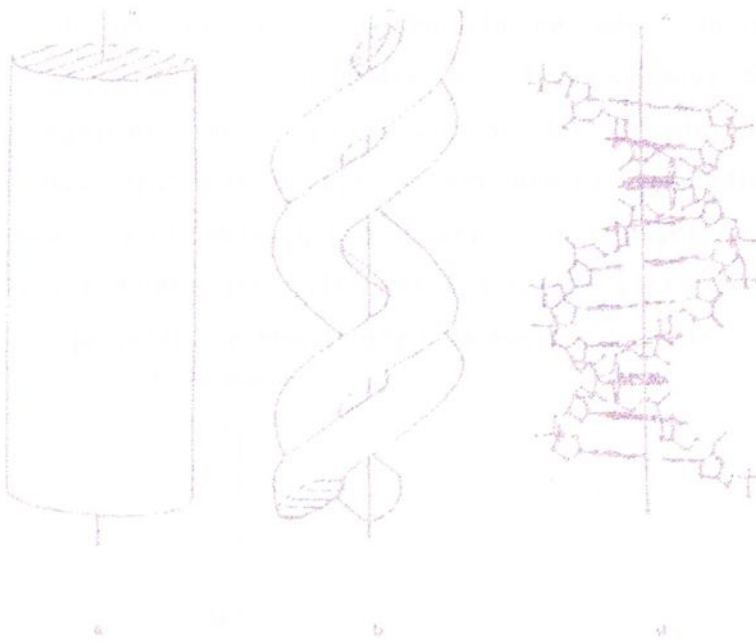


Figura 1 - Três modelos de DNA: (a) Um fragmento de um bastão (ou fita) elástico, homogêneo com seção circular; (b) Dois bastões elásticos formando a dupla hélice; (c) Um modelo de B-DNA, obtido por simulação computacional.

Passando para modelos discretos, a situação mais simples é considerar uma cadeia formada por discos (ou contas) conectados umas às outras por molas longitudinais (figura - 2a). Uma complexidade adicional pode ser obtida adotando um modelo planar e discreto constituído de duas cadeias de discos (ou contas) conectadas umas às outras por meio de molas longitudinais e transversais (figura - 2b), sendo o coeficiente de rigidez das molas longitudinais maior que o das transversais. O modelo da figura - 2b foi inspirado em Peyrard-Bishop⁽³⁾



Figura 2 - O análogo discreto do modelo de Barkley e Zimm (a) e o de nosso modelo (b)

Para cada par de bases, no modelo adotado⁽³⁾ inclui dois graus de liberdade (u_n e v_n) que correspondem aos deslocamentos das bases de suas posições de equilíbrio ao longo da direção das ligações de hidrogênio que conectam as duas bases em um par, os movimentos longitudinais da cadeia são desconsiderados nesta abordagem. Segundo investigações anteriores sobre o DNA (ver, por exemplo, ref. [7]), uma boa função para simular as ligações de hidrogênio é o potencial de Morse, que será adotado por nós.

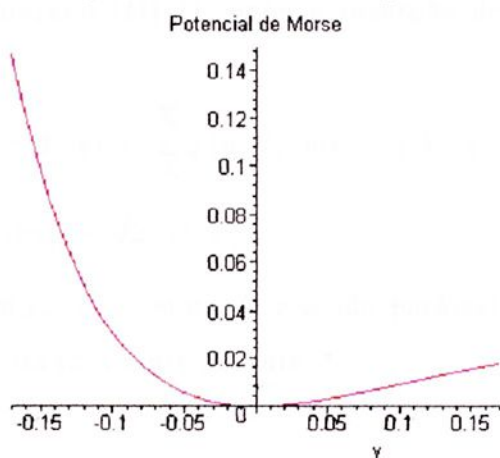


Figura 3.- Curva é representativa do Potencial de Morse em eV e y em Å. Os parâmetros a e D (ver equação III - 4), estão relacionados com a abertura da curva e a profundidade do poço de potencial

Em relação às interações de empilhamento, é considerado um acoplamento harmônico, de forma que o Hamiltoniano para o modelo é:

$$H = \sum_N \frac{1}{2} m (\dot{u}^2 + \dot{v}^2) + \frac{1}{2} k [(u_n - u_{n-1})^2 + (v_n - v_{n-1})^2] + V(u_n - v_n) \quad (\text{III-1})$$

onde $V(u_n - v_n)$ é o potencial de Morse, m representa a massa dos nucleotídeos e k é a constante de mola que liga os nucleotídeos ao longo da cadeia. Por simplicidade, são negligenciadas as inomogeneidades devidas às seqüências de bases e as assimetrias das duas fitas. Usamos também uma mesma massa m para as bases e adotamos igual procedimento com a constante de acoplamento ao longo de cada fita. O potencial de Morse é um potencial médio, representando as duas ou três ligações que conectam as duas bases em um par, cujos parâmetros obtidos podem ser estimados a partir de resultados experimentais. Outros potenciais^(10,11) têm sido sugeridos, dentro deste modelo, para simular as ligações de Hidrogênio. Entretanto, o potencial de Morse tem sido o mais usado para este fim^(7,12-14).



Podemos obter resultados físico-matemáticos mais concisos e adequados, se descrevermos os movimentos das duas fitas em termos das variáveis:

$$x_n = (u_n + v_n) / \sqrt{2} \quad (\text{III-2})$$

$$y_n = (u_n - v_n) / \sqrt{2} \quad (\text{III-3})$$

que representam, respectivamente, os movimentos transversais das bases em fase e fora de fase, em relação ao eixo da dupla fita.

O Hamiltoniano (III-1), após a inserção de (III-2) e (III-3), pode ser reescrito como:

$$H = H(x) + H(y) = \sum_N \{ p_n^2 / (2m) + \frac{1}{2} k (x_n - x_{n-1})^2 \} + \sum_N \{ q_n^2 / (2m) + \frac{1}{2} k (y_n - y_{n-1})^2 + D [\exp(-a \sqrt{2} y_n) - 1]^2 \} \quad (\text{III-4})$$

onde $p_n = m \dot{x}_n$, $q_n = m \dot{y}_n$, D e a são parâmetros do potencial de Morse (Figura 3) que serão fixados mais adiante.

Para uma cadeia contendo N pares de bases, a função partição clássica, dada em termos do Hamiltoniano (III-4), pode ser fatorada como:

$$Z = Z_x \cdot Z_y \cdot Z_p \cdot Z_q \quad (\text{III-5})$$

Em termos da coordenada de momento p a função partição é escrita como uma integral gaussiana e pode ser calculada analiticamente. Assim, temos

$$Z_p = \prod_{n=1}^N \int_{-\infty}^{\infty} dp_n \cdot \exp[-\beta \cdot p_n^2 / (2m)] = (2\pi m k_B \cdot T)^{N/2} \quad (\text{III-6})$$

Como usual, $\beta = 1/(k_B T)$ onde k_B é a constante de Boltzmann ($8,6 \cdot 10^{-5}$ eV/K) e T corresponde a temperatura em kelvin.

Por analogia, podemos afirmar que $Z_p = Z_q$, ou seja:

$$Z_p = \prod_{n=1}^N \int_{-\infty}^{\infty} dq_n \cdot \exp[-\beta \cdot q_n^2 / (2m)] = (2\pi m k_B \cdot T)^{N/2} \quad (\text{III-7})$$

Agora vamos calcular a função partição com respeito à coordenada x , Z_x

$$Z_x = \prod_{n=1}^N \int_{-\infty}^{\infty} dx_n \exp[-a (x_n - x_{n-1})^2] \quad (\text{III-8})$$

Observa-se que esta expressão corresponde a uma sequência de integrais gaussianas o que permite obter a solução analítica:

$$Z_x = (2\pi/\beta k)^{1/2} \quad (\text{III-9})$$

Finalmente, para calcular a função partição Z_y devemos lembrar que ela tem a seguinte forma:

$$Z_y = \prod_{n=1}^N \int_{-\infty}^{\infty} dy_n \exp[-\beta f(y_{n,n-1})] \quad (\text{III-10})$$

onde temos do Hamiltoniano (III-4):

$$f(y_n, y_{n-1}) = [(1/2)k (y_n - y_{n-1})^2 + V(y_n)] \quad (\text{III-11})$$

e, portanto:

$$Z_y = \int_{-\infty}^{\infty} dy_1 dy_2 \dots dy_n \dots dy_N \exp\{-\beta \sum_N [(1/2)k (y_n - y_{n-1})^2 + V(y_n)]\} \quad (\text{III-12})$$

Voltando a relação (III-10), podemos escrever:

$$Z_y = \int_{-\infty}^{\infty} \dots \int_{-\infty}^{\infty} dy_1 dy_2 \dots dy_N \exp[-\beta f(y_2 - y_1) \dots - \beta f(y_N - y_{N-1})] \quad (\text{III-13})$$

Inserindo uma função delta, esta equação pode ser reescrita:

$$Z_y = \int_{-\infty}^{\infty} d\bar{y} dy_1 \dots dy_N \delta(\bar{y} - y_1) \cdot \{[\exp-\beta \cdot f(y_2 - y_1)] \dots [\exp-\beta \cdot f(y_N - y_{N-1})] \\ [\exp-\beta \cdot f(y_N - \bar{y})]\} \quad (\text{III-14})$$

Por outro lado, a função delta pode ser formalmente expandida: $\delta(y_1 - \bar{y}) = \sum_i \psi_i^*(\bar{y}) \psi_i(y_1)$, o que permite obter a função partição na seguinte forma

$$Z_y = \sum_i \int_{-\infty}^{\infty} d\bar{y} dy_1 \dots dy_N \psi_i^*(\bar{y}) \{[\exp-\beta \cdot f(y_2 - y_1)] \dots [\exp-\beta \cdot f(y_N - y_{N-1})] \\ [\exp-\beta \cdot f(y_N - \bar{y})]\} \Psi_i(y_1) \quad (\text{III-15})$$

Agora vamos introduzir o operador de integral de transferência como sendo:

$$\int dy_{n-1} [\exp-\beta \cdot f(y_n, y_{n-1})] \Psi_i(y_{n-1}) = [\exp-\beta \epsilon_1] \Psi_i(y_n) \quad (\text{III-16})$$

É importante observar que o operador integral de transferência só fornece soluções analíticas exatas se por meio dele chegarmos a uma equação tipo Schrödinger e a função de onda que nele aparece satisfizer esta equação.

Assim, podemos escrever:

$$\int_{-\infty}^{\infty} dy_1 [\exp-\beta \cdot f(y_2, y_1)] \Psi_i(y_1) = [\exp-\beta \epsilon_1] \Psi_i(y_2) \quad (\text{III-17})$$

e assim por diante, para cada par de coordenadas consecutivas.

Este operador pode ser aplicado N vezes, introduzindo autovalores ϵ_i a cada passo. Este processo conduz a

$$Z_y = \sum_{l=0}^{\infty} [\exp(-\beta \epsilon_l)]^N = [\exp(-\beta N \epsilon_0) \{1 + \exp[-\beta N(\epsilon_1 - \epsilon_0)] \exp[-\beta N(\epsilon_2 - \epsilon_1)] \dots\}] \quad (\text{III-18})$$

Como N é um valor muito grande o resultado é dominado pelo autovalor do estado fundamental ϵ_0 . Assim, os termos exponenciais dentro de chaves (Eq. III-18) podem ser desprezados restando apenas a unidade, daí obtemos:

$$Z_y = \exp[-N\beta\epsilon_0] \quad (\text{III-19})$$

Por outro lado, conhecendo o valor de $f(y_n, y_{n-1})$, dado pela equação (III-11), o operador integral de transferência é escrito como:

$$\int_{-\infty}^{\infty} dy_{n-1} \exp\{-\beta[1/2 k(y_n - y_{n-1})^2 + V(y_n)]\} \Psi_1(y_{n-1}) = \exp(-\beta\epsilon_1) \Psi_1(y_n) \quad (\text{III-20})$$

Expandindo a função $\Psi_1(y_{n-1})$ em série de Taylor em torno de y_n , obtemos:

$$\Psi(y_{n-1}) = \Psi(y_n) + [(y_{n-1} - y_n)](d\Psi_1/dy)_{y=y_n} + [(y_{n-1} - y_n)^2/2!](d^2\Psi_1/d^2y)_{y=y_n} + \dots \quad (\text{III-21})$$

Assim, a integral na variável y_{n-1} , expressão (III-20), pode ser escrita:

$$\exp[-\beta V(y_n)] \int_{-\infty}^{\infty} dy_{n-1} \exp[-(\beta k/2)(y_n - y_{n-1})^2] \{\Psi_1(y_n) + [(y_{n-1} - y_n)] \Psi_1' + [(y_{n-1} - y_n)^2/2!] \Psi_1'' + \dots\} = \exp(-\beta\epsilon_1) \Psi_1(y_n) \quad (\text{III-22})$$

onde o termo do potencial foi colocado em evidência uma vez que nele há apenas dependência da variável y_n .

Considerando a expansão até a segunda ordem, a integral acima pode ser dividida em três partes exatamente integráveis:

$$\int_{-\infty}^{\infty} dy_{n-1} \exp[-(\beta k/2)(y_n - y_{n-1})^2] \Psi_1(y_n) = \sqrt{2\pi/(\beta k)} \Psi_1(y_n) \quad (\text{III-23})$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} dy_{n-1} \exp[-(\beta k/2)(y_n - y_{n-1})^2] (y_{n-1} - y_n) \Psi_1(y_n) = 0 \quad (\text{III-24})$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} dy_{n-1} \exp[-(\beta k/2)(y_n - y_{n-1})^2] [(y_{n-1} - y_n)^2/2!] \Psi_1(y_n) = (1/2) [\sqrt{\pi}/(-\beta k/2)^{3/2}] \quad (\text{III-25})$$

Nos cálculos foi usado a substituição de variáveis: $w = y_n - y_{n-1}$, o que evidencia o aparecimento de integrais gaussianas. Foi lembrado também que a integral entre extremos simétricos de uma função com integrando ímpar é igual a zero.

Voltando a equação (III-22) e usando as integrais acima, obtemos:

$$\exp[-\beta V(y_n)] \sqrt{2\pi/(\beta k)} \cdot [1 + 1/(2\beta k) d^2/dy_n^2] \Psi_1(y_n) = \exp(-\beta \epsilon_1) \Psi_1(y_n) \quad (\text{III-26})$$

Formalmente podemos entender a expressão entre colchetes, como a expansão de uma exponencial:

$$\exp\{1/(2\beta k) d^2/dy_n^2\} = 1 + 1/(2\beta k) (d^2/dy_n^2) + \dots \quad (\text{III-27})$$

Desta forma, o operador integral de transferência pode ser reescrito da seguinte maneira:

$$\int dy_{n-1} [\exp-\beta f(y_n, y_{n-1})] \Psi_1(y_{n-1}) = \exp\{1/(2\beta k) d^2/dy_n^2 - (\beta V(y_n) + 1/2 \ln(2\pi/\beta k))\} \Psi_1(y_n) \quad (\text{III-28})$$

Juntando esta nova forma com a definição do operador integral de transferência, na relação (III-26), obtemos:

$$\exp\{1/(2\beta k) d^2/dy_n^2 - \beta V(y_n) + 1/2 \ln(2\pi/\beta k)\} \Psi_1(y_n) = \exp[-\beta \epsilon_1] \Psi_1(y_n) \quad (\text{III-29})$$

ou, finalmente

$$\{-1/(2\beta^2 k) d^2/dy_n^2 + V(y_n)\} \Psi(y_n) = \{\epsilon_1 + 1/(2\beta) \ln(2\pi/(\beta k))\} \Psi(y_n) \quad (\text{III-30})$$

Esta equação é formalmente idêntica à equação de Schrödinger, ela permite estudar a função partição Z_y e obter informações sobre o problema.

III.2 - Estiramento médio dos pares de bases

Considerando a equação (III-4), temos que o Hamiltoniano para o modelo é então dado por

$$H = \sum_N \{ [(1/2)m \dot{x}_n^2 + k/2(x_n - x_{n-1})^2] + [(1/2)m \dot{y}_n^2 + (k/2)(y_n - y_{n-1})^2 + D [\exp(-ay_n) - 1]^2] \} \quad (\text{III-31})$$

Observa-se que a parte do Hamiltoniano que depende da variável x_n está desacoplada da parte em y_n e corresponde meramente a uma cadeia harmônica, sem potencial substrato. Ela é bem comportada e não contribui para a abertura dos pares de base, assim podemos ignorar este termo na análise estatística deste modelo. Portanto, iremos nos concentrar apenas a parte do Hamiltoniano que depende de y_n ,

$$H_y = \sum_N \{ [(1/2m) \dot{y}_n^2 + (k/2) (y_n - y_{n-1})^2] + D[\exp(-ay_n) - 1]^2 \} \quad (\text{III-32})$$

Uma vez que estamos interessados na transição térmica de desnaturação da molécula, a abordagem, natural é investigar a mecânica estatística do modelo. Devido ao caráter unidimensional do modelo e como as interações são restritas a interações entre os vizinhos mais próximos, isto pode ser tratado analiticamente, incluindo não linearidades, pelo método do operador integral de transferência. Para uma cadeia contendo N unidades com condições de contorno periódicas, a função partição clássica, dada em termos do Hamiltoniano (III-32), fornece os seguintes resultados:

$$Z_y = \int_{-\infty}^{\infty} \prod_{n=1}^N dy_n \exp[-\beta f(y_n, y_{n-1})] \quad (\text{III-33})$$

Onde $f(y_n, y_{n-1})$ denota a energia potencial em y_n do Hamiltoniano (III-32). A integral acima pode ser calculada exatamente, no limite termodinâmico de um número muito grande de partículas, ($N \rightarrow \infty$) usando as autofunções e auto valores do operador integral de transferência como indicado anteriormente.

Uma quantidade usada para caracterizar a desnaturação da molécula é o estiramento médio $\langle y \rangle$ das ligações de hidrogênio que é dada pôr:

$$\langle y \rangle = (1/Z_y) \int_{-\infty}^{\infty} \prod_{n=1}^N y_n \exp[-\beta f(y_n, y_{n-1})] dy_n \quad (\text{III-34})$$

Como o modelo é considerado homogêneo, o resultado não depende do sítio particular considerado. Esta integral pode ser determinada com o auxílio do método da integral de transferência e fornece:

$$\langle y \rangle = \left[\sum_{n=1}^N \langle \Phi_1(y) | y | \Phi_1(y) \rangle e^{-N\beta \epsilon_1} \right] / \left[\sum_{n=1}^N \langle \Phi_1(y) | \Phi_1(y) \rangle e^{-N\beta \epsilon_1} \right] \quad (\text{III-35})$$

onde $\Phi_1(y)$ seriam as soluções para a equação tipo-Schrödinger (III-30) com a função $V(y_n)$ dado pelo potencial de Morse. No limite para N grande, o resultado é dominado pelo autovalor inferior ϵ_0 , associado com a autofunção normalizada $\Phi_0(y)$. Portanto,

$$\langle y \rangle = \langle \Phi_0 | y | \Phi_0 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_0^2(y) y dy \quad (\text{III-36})$$

Neste caso, o problema de autovalor na integral de transferência é reduzido a seguinte equação tipo Schrödinger:

$$-\left[1/(\beta^2 2k) \right] \left[d^2 \Phi_1 / dy^2 \right] + D(e^{-2ay} - 2e^{-ay}) \Phi_1(y) = (\epsilon_1 - s_0 - D) \Phi_1(y) \quad (\text{III-37})$$

com $s_0 = (1/2 \beta) \ln(\beta k / 2\pi)$.

A equação (III-37) é formalmente idêntica à equação de Schrödinger para uma partícula em um potencial de Morse, de maneira que ela pode ser resolvida exatamente⁽¹⁵⁾ fornecendo:

$$\Phi_0(y) = (\sqrt{2} a)^{1/2} [(2d)^{d-1/2}] / [\Gamma(2d-1)]^{1/2} \exp[-d \cdot \exp(-\sqrt{2} ay)] \cdot \exp[-(d-1/2) \cdot \sqrt{2} ay] \quad (\text{III-38})$$

onde $d = (\beta/a)(2kD)^{1/2} > 1/2$. Quando $d < 1/2$ a solução fornece um espectro discreto, o qual corresponde a autofunções localizadas. Para $d = 1/2$ podemos estabelecer uma temperatura crítica $T_m = [2 (2kD)^{1/2} / ak_B]$. Se $d > 1/2$ ou, em outras palavras, a temperatura é maior que T_m , a equação de Schrödinger tem apenas estados deslocalizados. Portanto, nós podemos considerar T_m como a temperatura de desnaturação.

A expressão do autovalor do estado fundamental para a equação (III-37) é também conhecida^(14,15) e vale:

$$\epsilon_0 = (1/2\beta) \ln(\beta k / 2\pi) + (a/\beta) [D/2k]^{1/2} - (a^2 / \beta^2 k) \quad (\text{III-39})$$

Procurando dar realismo às propriedades do sistema em estudo, as constantes que aparecem no modelo foram fixadas usando resultados experimentais¹⁷⁻²². Assim, foi considerado que a massa de cada partícula vale $m = 300$ a.m.u.; o fator de escala espacial do potencial de Morse é dado por $a = 4,45 \text{ \AA}^{-1}$; a energia de dissociação é $D = 0,04 \text{ eV}$; e a constante elástica das molas que simulam as interações de empilhamento em cada cadeia foi fixada como sendo $k = 0,06 \text{ eV/\AA}^2$ ^(12,14). Com estes valores obtivemos a temperatura de desnaturação $T_m \approx 361 \text{ K}$ (Ver apêndice C).

Podemos também trabalhar com o estiramento médio das bases, ou seja, com $\langle y \rangle$. Esta grandeza é calculada pela expressão (III-36) usando a função de onda apropriada para o potencial de Morse dada em (III-38). A integração pode ser feita numericamente permitindo a análise do resultado de $\langle y \rangle$ em função da temperatura, T . A integração é feita usando o programa Maple, os detalhes podem ser vistos no Apêndice B, e o resultado é mostrado na figura III-3. Esta figura mostra o comportamento do estiramento médio, dado em ângstron, em função da temperatura,

dada em kelvin. O intervalo de temperatura adotado foi de 100K até 365K. Nota-se que a curva ascende lenta e gradualmente até por volta de 300K, sendo que em torno de 360K ocorre uma acentuada divergência caracterizando a desnaturação térmica. Esta temperatura reforça o valor obtido pela análise direta da função de onda feito anteriormente.

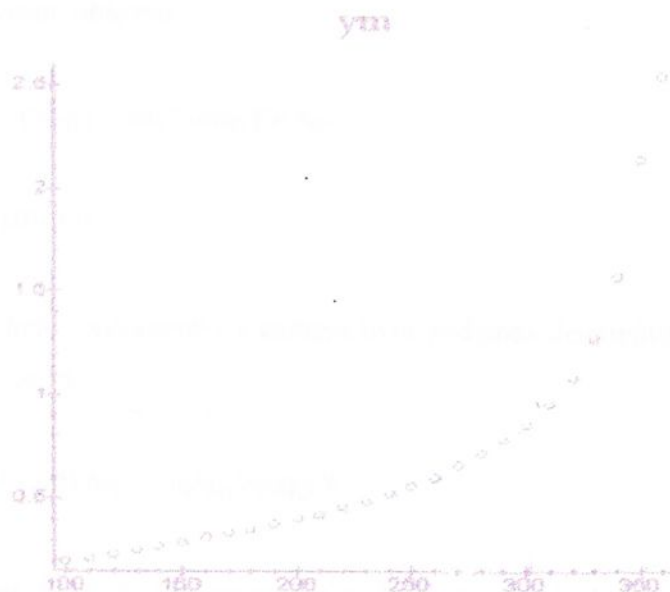


Figura III-3: Estiramento médio $\langle y_m \rangle$ versus Temperatura

III.3 - Capacidade calorífica

No caso em que $T < T_m$, nós determinamos a função partição e podemos calcular a energia livre do modelo juntando as diferentes contribuições em Z , ou seja,

Z_q, Z_y, Z_p e Z_x . Assim, obtemos

$$\mathfrak{Z} = -k_B T \ln(Z) = -(Nk_B T/2) \ln(2\pi m k_B T) + N\epsilon_0 \quad (\text{III-40})$$

com ϵ_0 dado por (III-39).

Por outro lado, conhecendo a energia livre podemos determinar a capacidade calorífica pela definição:

$$C_V = -T \partial^2 \mathfrak{Z} / \partial T^2 = (3/2) Nk_B + (a^2 k_B^2 N / 4k) T \quad (\text{III-41})$$

Para valores de $T > T_D$, devemos manipular o sistema de forma diferente, pois haverá desnaturação e conseqüente rompimento das ligações de Hidrogênio, o potencial de Morse não mais atua e obtemos um Hamiltoniano mais simples para o sistema.

Considerando que não mais existem interações tipo potencial de Morse entre as fitas adjacentes, teremos uma configuração de fitas 'disjuntas'. O Hamiltoniano para este sistema pode ser expresso como⁽¹⁶⁾:

$$H = \sum_N [P_n^2 / (2m) + Q_n^2 / (2m) + k/2(u_n - u_{n-1})^2 + k/2(v_n - v_{n-1})^2] \quad (\text{III-42})$$

que corresponde ao Hamiltoniano (III-1) com potencial entre as cadeias nulo, $V(u_n - v_n) = 0$. Os dois primeiros termos representam a energia cinética do sistema, onde

$$P_n = m \dot{u}_n \text{ e } Q_n = m \dot{v}_n.$$

O Hamiltoniano (III-42) tem as variáveis desacopladas, nestas circunstâncias a função partição correspondente é dada pôr

$$Z = Z_p \cdot Z_q \cdot Z_u \cdot Z_v = \prod_{n=1}^N \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} dP_n \exp[-\beta P_n^2/(2m)] \int_{-\infty}^{\infty} dQ_n \exp[-\beta Q_n^2/(2m)] \right. \\ \left. \int_{-\infty}^{\infty} du_n \exp[-\beta k/2(u_n - u_{n-1})^2] \int_{-\infty}^{\infty} dv_n \exp[-\beta k/2(v_n - v_{n-1})^2] \right\} \quad (\text{III-43})$$

Todas as integrais envolvidas na função partição acima são do tipo gaussiana e podem se resolvidas analiticamente levando a:

$$Z_p = Z_q = (2\pi mk_B T)^{N/2} \quad (\text{III-44})$$

$$Z_u = Z_v = (2\pi/\beta k)^{N/2} \quad (\text{III-45})$$

Assim, a função partição total é escrita como:

$$Z = (2\pi mk_B T)^N (2\pi/\beta k)^N \Rightarrow Z = (m/k)^N (2\pi k_B T)^{2N} \quad (\text{III-46})$$

Considerando a definição de energia livre em termos da função partição Z (III-40), temos:

$$\mathfrak{Z} = -k_B T \cdot \ln(Z) = -Nk_B T \ln(m/k) - 2Nk_B T \ln(2\pi k_B T) \quad (\text{III-47})$$

Agora considerando a definição de capacidade calorífica em termos da energia livre (III-41), temos:

$$C_v = -T \partial^2 \mathfrak{Z} / \partial T^2 = 2k_B N \quad (\text{III-48})$$

ou finalmente se quisermos expressar de forma mais conveniente, temos

$$C_v/k_B N = 2 \quad (\text{III-49})$$

Este resultado mostra que a capacidade calorífica (C_v) permanece constante após a temperatura de desnaturação.

A figura 5 mostra um gráfico de $C_v/k_B N$ contra a temperatura. A capacidade

calorífica aumenta linearmente com a temperatura, como dado pela relação (III-41), até a temperatura de desnaturação ($T = T_m = 361 \text{ K}$); após este valor C_V permanece constante.

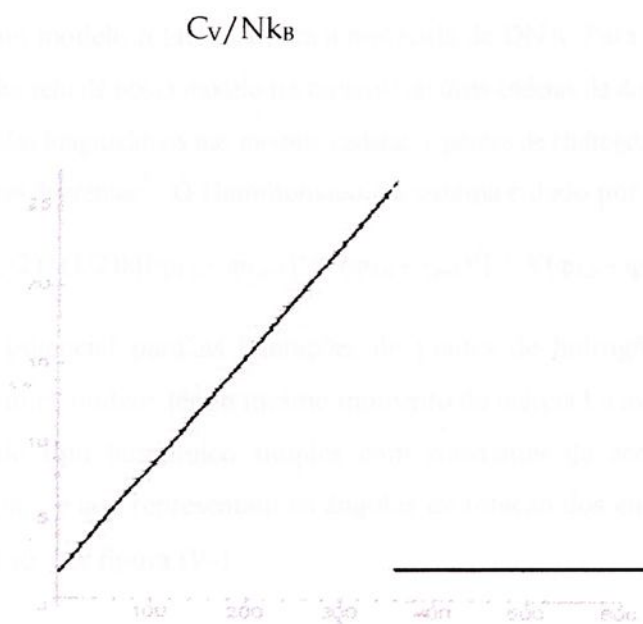


Figura – 5: Calor específico ($C_V/k_B N$) como função da temperatura absoluta (T).

Este gráfico foi obtido usando as condições para $T < T_D$ e $T > T_D$.

IV - MODELO ROTACIONAL PARA A MOLÉCULA DE DNA

IV.1 - Descrição do modelo

Vamos considerar um modelo rotacional para a molécula de DNA. Para isto, podemos supor que o análogo planar, discreto de nosso modelo irá consistir de duas cadeias de discos conectados uns aos outros por meio de molas longitudinais nas mesmas cadeias e pontes de Hidrogênio transversais entre discos vizinhos em cadeias diferentes⁽⁹⁾. O Hamiltoniano do sistema é dado por

$$H = \sum_N \{ (I\dot{\varphi}_{1,n}^2/2 + I\dot{\varphi}_{2,n}^2/2) + (1/2)k[(\varphi_{1,n} - \varphi_{1,n-1})^2 + (\varphi_{2,n} - \varphi_{2,n-1})^2] + V(\varphi_{1,n} - \varphi_{2,n}) \} \quad (\text{IV-1})$$

onde $V(\varphi_{1,n} - \varphi_{2,n})$ é o potencial para as interações de pontes de hidrogênio. Estamos considerando que todos os nucleotídeos têm o mesmo momento de inércia I e as interações de empilhamento são todas do tipo harmônico simples com constantes de acoplamento, k , iguais. Na equação (IV-1) $\varphi_{1,n}$ e $\varphi_{2,n}$ representam os ângulos de rotação dos n -ésimos discos de suas posições de equilíbrio, ver figura IV-1.

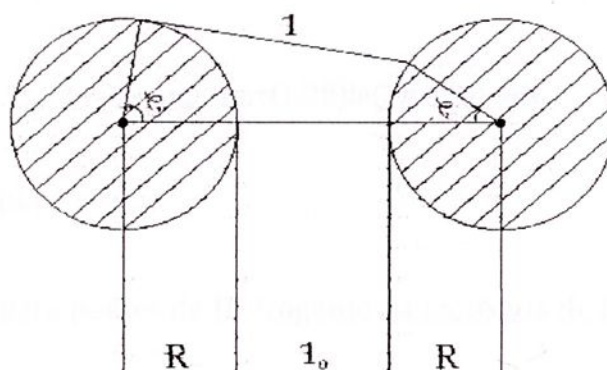


Figura IV-1: Secção reta do modelo constituído por duas pilhas (cadeias) de discos.

A equação (IV-1) pode ser reescrita em termos das variáveis:

$$x_n = (\varphi_{1,n} + \varphi_{2,n}) / \sqrt{2} \quad (\text{IV-2})$$

$$y_n = (\varphi_{1,n} - \varphi_{2,n}) / \sqrt{2} \quad (\text{IV-3})$$

ou seja:

$$H = \sum_{n=1}^N \{[(p_n)^2/(2I)] + (1/2)k(x_n - x_{n-1})^2\} + \sum_{n=1}^N \{[(q_n)^2/(2I)] + (1/2)k(y_n - y_{n-1})^2 + V(\sqrt{2} y_n)\} \quad (\text{IV-4})$$

Neste caso, os momentos p_n e q_n estão associados a momentos angulares, assim como as variáveis x_n e y_n .

A função partição para N pares de bases, é:

$$Z = Z_p Z_q Z_x Z_y = \prod_{n=1}^N \int dp_n dq_n dx_n dy_n \cdot e^{-\beta H} \quad (\text{IV-5})$$

Os procedimentos para o cálculo de Z são análogos aos adotados no capítulo anterior para o movimento vibracional. As integrais em p , q e x são do tipo gaussianas e avaliadas diretamente

$$Z_p = Z_q = (2\pi I k_B T)^{N/2} \quad e$$

$$Z_x = (4\pi/\beta k)^{N/2}.$$

Para determinar a integração em y usamos novamente o operador integral de transferência, e a equação tipo Schrödinger a ser estudada é análoga à equação (III-30), ressaltando a definição das variáveis que agora representam grandezas angulares. Essa equação é:

$$\{-1/(2\beta^2 k) d^2/dy_n^2 + V(\sqrt{2} y_n)\} \psi_l(y_n) = \{e_l + (1/2\beta) \ln(2\pi/\beta k)\} \psi_l(y_n) \quad (\text{IV-6})$$

onde

$$s_0 = (1/2\beta) \ln(2\pi/\beta k). \quad (\text{IV-7})$$

IV.2 - Potencial para pontes de Hidrogênio na molécula de DNA

Existem vários tipos de potenciais sendo usados para simular as pontes de hidrogênio em termos de variáveis angulares^(9,17). A função potencial que propomos neste trabalho para as pontes de hidrogênio é:

$$V(\sqrt{2} y_n) = (a^2 k \beta^2 / 2) [1 - \cos 2(\sqrt{2} y_n)] + a [1 - \cos(\sqrt{2} y_n)] \quad (\text{IV-8})$$

onde a e k são constantes a serem determinadas. Este potencial é do tipo dupla sine-Gordon e tem sido usado em vários contextos ligados ao estudo de sistemas moleculares como, por exemplo, transporte de prótons em cadeias unidas por pontes de hidrogênio⁽¹⁸⁾.

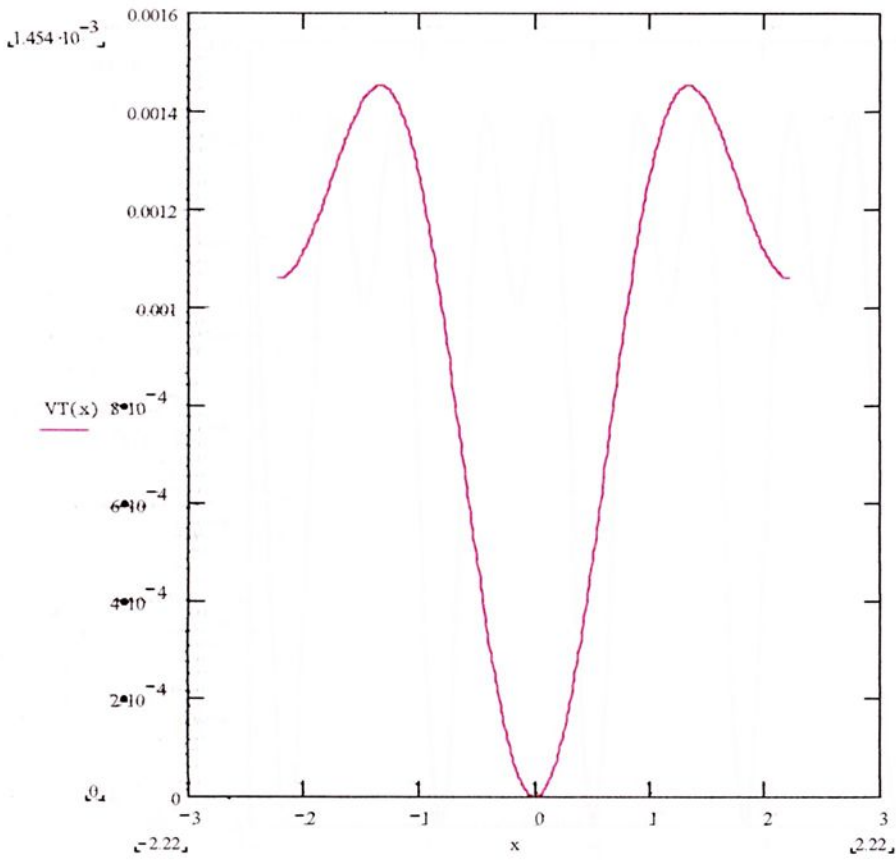


Figura IV-2: Um ciclo do potencial dupla sine-Gordon, mostrando um poço de potencial profundo ladeado por dois mais rasos

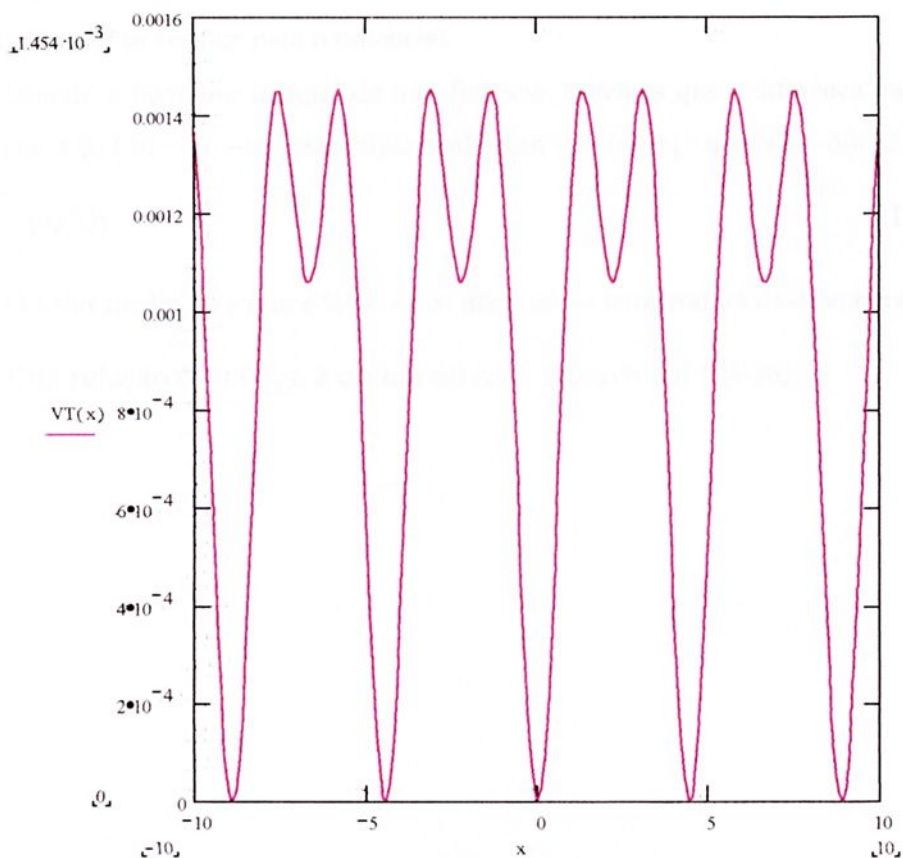


Figura IV-3: Periodicidade da função potencial dupla sine-Gordon.

Usando esse potencial na equação tipo Schrödinger é possível determinar a “função de onda” e o autovalor do estado fundamental. Eles valem, respectivamente,

$$\psi_0 = A \exp[ak\beta^2 \cos(\sqrt{2} y)] \quad (\text{IV-9})$$

e

$$\varepsilon_0 = a + s_0 = a + \frac{1}{2\beta} \left[\frac{\beta k}{2\pi} \right] \quad (\text{IV-10})$$

onde A é a constante de normalização. A relação entre os parâmetros do potencial sugerido é importante para determinar a solução analítica indicada acima. Métodos algébricos podem ser empregados para obtenção desta solução, contudo esse resultado pode ser facilmente verificado por substituição direta na equação diferencial (IV-6).

O potencial usado, assim como as autofunções obtidas, é periódico. Para a análise a ser realizada será considerado apenas o primeiro período. Nós observamos que as autofunções

possuem periodicidade idêntica a $\cos(\sqrt{2} y)$, assim as variáveis variam entre extremos $y_0 = \pm \pi/\sqrt{2}$. O mesmo se verifica para o potencial.

Usando o operador integral de transferência, sabemos que a diferença média entre os ângulos φ_1 e φ_2 ($\Delta\theta = \varphi_1 - \varphi_2$) está relacionada com $\langle y \rangle$ ($= \langle \varphi_1 - \varphi_2 \rangle / \sqrt{2} = \Delta\theta / \sqrt{2}$ que vale:

$$\langle y \rangle = \int_{-y_0}^{+y_0} y \psi_0^2 dy \quad (\text{IV-11})$$

O valor médio de y que é $1/2$ do valor máximo $\rightarrow$ temperatura de desnaturação.

Esta relação é análoga à obtida no caso vibracional (III-36).



Para fixar os parâmetros identificamos o último termo da função potencial com o potencial de sine-Gordon. A combinação da informação obtida da dinâmica do modelo sine-Gordon com dados de espalhamento de nêutrons, levou os autores da ref [19] a proporem valores para os parâmetros k e a . Trabalhos teóricos encontrados na literatura^(20,21) tem usado estes valores para analisar a dinâmica do sistema. Nesta linha de ação fixamos $a = 5,3 \times 10^{-4}$ eV e $k = 2$ eV.

$\langle y \rangle$ em radianos no eixo vertical e Temperatura T (K) no horizontal

$\langle y \rangle$ em radianos no eixo vertical e Temperatura T (K) no horizontal

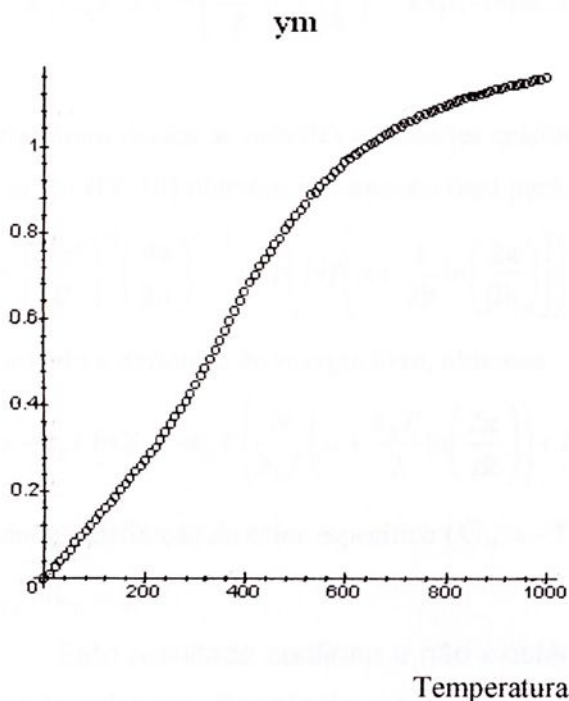


Figura IV-4: Variação da diferença média $\langle y \rangle = (\varphi_1 - \varphi_2)/\sqrt{2}$ entre os ângulos (radianos) da cadeia como função da temperatura (K).

A figura IV - 4 mostra a variação da diferença angular média, $\Delta\theta = \sqrt{2} y$, como função da temperatura. A curva é obtida numericamente a partir da expressão (IV-11) com a autofunção indicada de (IV-9). A constante de normalização é obtida por integração numérica.

A curva apresentada na figura mostra um crescimento rápido no início, estabilizando a altas temperaturas. O valor assintótico ($T \rightarrow \infty$) fornece uma variação angular $\Delta\theta = 1,8$ rad = 103° . O valor mediano para $\Delta\theta$ é $0,904$ rad ou cerca de 52° , o que ocorre a $T = 386$ K. Esta temperatura é próxima ao valor encontrado experimentalmente para poli CG, 372 K. Estes resultados parecem indicar a existência de desnaturação térmica induzida por movimentos

rotacionais dos pares de base. Entretanto uma análise da capacidade calorífica em função da temperatura para o modelo mostra a inexistência de uma transição.

IV.3 – Capacidade Calorífica

A capacidade calorífica pode ser determinada da energia livre, que por sua vez pode ser obtida da função partição. No modelo adotado temos:

$$Z = Z_p Z_q Z_x Z_y = \left(\frac{2\pi I}{\beta} \right)^N \left(\frac{4\pi}{\beta k} \right)^{N/2} \exp(-N\beta\epsilon_0) \quad (\text{IV-12})$$

onde foram usadas as relações expressões analíticas obtidas para Z_p , Z_q e Z_x . Usando o valor de ϵ_0 por (IV-10) obtemos a expressão final para a função partição.

$$Z = \left(\frac{2\pi I}{\beta} \right)^N \left(\frac{4\pi}{\beta k} \right)^{N/2} \exp \left(N\beta \left[a + \frac{1}{2\beta} \ln \left(\frac{2\pi}{\beta k} \right) \right] \right) \quad (\text{IV-13})$$

E, usando a definição de energia livre, obtemos

$$\mathfrak{F} = -k_B T \ln Z = -k_B T \left\{ \frac{N}{k_B T} \left(a + \frac{k_B T}{2} \ln \left(\frac{2\pi}{\beta k} \right) \right) + N \ln(2\pi k_B T) + \frac{N}{2} \ln \left(\frac{2\pi k_B T}{k} \right) \right\} \quad (\text{IV-14})$$

Usando a definição de calor específico ($C_v = -T \partial^2 \mathfrak{F} / \partial T^2$), podemos escrever:

$$C_v / Nk_B = 2 \quad (\text{IV-15})$$

Este resultado confirma a não existência de transição (desnaturação) para o modelo adotado. Entretanto, as características da figura IV – 2, principalmente o crescimento pronunciado, permitem inferir que o movimento rotacional deve atuar como colaborador na desnaturação em conjunção com o movimento vibracional.



V – Conclusão

Consideramos os capítulos II – 1 e II – 2 como introdutórios e parte necessária à compreensão dos capítulos seguintes. Apesar disso, é importante ressaltar as assimetrias da molécula de DNA, devidas em grande parte ao caráter não plano da pentose assim como dos pares de bases. Destacamos também como de importância fundamental as forças devidas às ligações de Hidrogênio, que garantem a estabilidade da molécula bem como as forças hidrofóbicas e de dispersão de London.

No tratamento do modelo vibracional dividimos o processo em duas regiões de temperatura, $T < T_m$ e $T > T_m$. Esta é uma abordagem clara e simples para descrever a desnaturação térmica do DNA em termos da capacidade calorífica, fornecendo um comportamento satisfatório para o fenômeno. Dois importantes resultados obtidos são a temperatura de desnaturação e a variação do calor específico como função da temperatura. O intervalo experimental da temperatura de desnaturação⁽⁶⁾ é de 318 K, para poli(dA-dT) · poli(dA-dT), até 372 K, poli(dG-dC) · poli(dG-dC). Assim, o resultado $T_m = 361$ K é aceitável (Ver apêndice C).

Ainda referente ao modelo vibracional, uma análise complementar consiste em explorar a sua dinâmica. Estes aspectos não foram discutidos neste trabalho mas podem ser encontrados, por exemplo, nas ref. [12] e [22], usando modelos bastante similares aos adotados aqui.

O modelo rotacional sugerido também permite a obtenção de resultados analíticos usando o operador integral de transferência. A abordagem considera o DNA como composto por duas cadeias paralelas com movimento rotacional dos nucleotídeos tendo lugar em um plano perpendicular com respeito às cadeias. O potencial entre os pares de bases é escolhido como sendo uma função dupla sine-Gordon. Os parâmetros



são estimados de resultados do modelo dinâmico sine-Gordon combinados com medidas experimentais.

Nós observamos que para temperaturas próximas à de desnaturação ($\sim 386\text{K}$), a diferença angular média obtida, próxima a 52° , está na região onde as ligações de hidrogênio são fracas. Contudo, a partir de um ponto de vista teórico nós não podemos considerar a desnaturação do DNA induzida apenas por movimentos angulares. A análise sobre o calor específico sugere que outra espécie de movimento deve estar incluída, no sentido de explicar o processo de desnaturação da macromolécula de DNA, por exemplo, estiramento dos pares de bases. Por outro lado, os resultados mostram haver importantes aspectos ligados aos movimentos rotacionais com relação à temperatura de desnaturação e seus efeitos na compreensão deste processo. Assim, podemos considerar muito interessante um acoplamento dos movimentos rotacional e de estiramento em um modelo unificado.

Os resultados obtidos para o modelo rotacional são robustos no sentido em que a mudança dos parâmetros no intervalo proposto na ref. [19] não altera as conclusões. Alterações que modifiquem o valor do produto ($a.k$) produzem como consequência uma translação na curva apresentada na figura IV – 3. Assim, o valor para a temperatura também varia, mas a forma da curva, o valor angular máximo (104°) e o valor médio para a diferença angular (52°) não se modificam.

Como destaque, os resultados pioneiros obtidos indicam que o movimento angular pode ser importante para diversas propriedades do DNA, como por exemplo, desnaturação local e processos de pré-desnaturação. Isto pode ser percebido devido à forma da curva mostrada na figura IV – 3 e o rápido aumento no valor da diferença angular no intervalo de temperatura situado entre 300 e 400 K.



Destacamos também que a aproximação da curva do modelo rotacional da temperatura de desnaturação possibilita uma série de novas análises. Podemos considerar que este modelo pode apresentar 'bolhas'; e aspectos para estudos são, como calcular bolhas a partir da mecânica estatística e como explicar a questão 'bolha' com aspectos bioquímicos e sua importância fenomenológica.

O modelo rotacional possivelmente, trabalha em colaboração com o modelo vibracional de forma que um estudo vibro-rotacional é bastante promissor como complementação deste trabalho.

A utilização do operador integral de transferência é uma ferramenta potente na elaboração desses trabalhos.



Referências

- [1]- DREW, B. *Understaing DNA*, Oxford University Press, New York, 1997.
- [2]- WATSON, J. D. and Crick, F. H. A., A Structure of desoxyribose nucleic acid, *Nature*, v. 171, p. 737-738, 1953.
- [3]- PEYRARD M. and BISHOP A. R., Statistical mechanics of a non-linear model for DNA denaturation, *Phys. Rev. Lett.*, v. 62, p. 2755-2758, 1989.
- [4]- VOET D., VOET J. G. e CHARLOTTE W. P., *Fundamentos de Bioquímica*, Porto Alegre, R.S., 2000.
- [5]- ROGER L. P., ADAMS, J. K. AND LEADER D. P., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall Ed., London, UK, 1992.
- [6]- SEANGER W., *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1984.
- [7]- GAETA G., REISS C., PEYRARD M. AND DAUXOIS T., Simple models of non-linear DNA dynamics, *Rev. Nuovo Cim.*, v. 17, p. 1-48, 1994.
- [8]- BARKLEY M. D., ZIMM B. H., Theory of twisting and bending of chain macromolecules: analysis of the fluorescence depolarisation of DNA, *J. Chem. Phys.*, v. 70, p. 2991-3007, 1979.
- [9]- YAKUSHEVICH L. V., Non-linear physics of DNA: a new model, *Phys. Lett. A*, v. 136, p. 413-417, 1989.
- [10]- VAN ZANDT L. L., DNA solitons with realistic parameter values, *Phys. Rev. A*, v. 40, p. 6134-6137, 1989.
- [11]- DRIGO E. AND RUGGIERO J. R., H-bond simulation in DNA using a harmonic isospectral potential, *Phys. Rev. A*, v. 56, p. 4486-4488, 1997.
- [12]- BARBI M., COCCO S. AND PEYRARD M., Helicoidal model for DNA opening, *phys. Lett. A*, v. 253, p. 358-366, 1999.
- [13]- TECHERA M., DAEMEN L. L. AND PROHOFSKY E. W., Non-linear model of the DNA molecule, *Phys. Rev. A*, v. 40, p. 6636-6642, 1989.



- [14]- DAUXOIS T., PEYRARD M. and BISHOP A. R., Thermodynamics of a non-linear model for DNA denaturation, *Physica D*, v. 66, p. 35-42, 1993.
- [15]-NIETO M. M. AND SIMMONS JR. L. M., Eigenvalues, coherent states and uncertainty products for the Morse oscillator, *Phys. Rev. A*, v. 19, p. 438-444, 1979.
- [16]- AUGUSTO P. S. P., DRIGO E. and RUGGIERO J. R., Statistical model to DNA melting, *Ecl. Quim.*, v. 26, p. 77-85, 2001.
- [17]- HOMMA S., Thermodynamics properties of coupled sine-lattice I: A method of calculation of a partition function, *Physica D*, v. 113, p. 202-211, 1998.
- [18]- A. ZOLOTARYUK and S. PNEVMATIKOS, One -component model for proton transport in hydrogen-bonded chain, *Phys. Lett. A*, v. 143, p. 233-238, 1990.
- [19]- V. K. FEDYANIN and L. V. YAKUSHEVICH, Scattering of neutrons and light by DNA solitons, *Stud. Biophys.*, v. 103, p. 171-178, 1984.
- [20]- SALERNO M., Dynamical properties of DNA, *Phys. Lett. A*, v. 167, p. 49-53, 1992.
- [21]- SALERNO M., Discrete model for DNA-promoter dynamics, *Phys. Rev. A*, v. 44, p. 5292-5297, 1991.
- [22]- ZDRAVKOVIC S. and SATARIC M. V., The impact of viscosity on the DNA dynamics, *Physical Script*, v. 64, 612-619, 2001.
- [23]- KITTEL C., Introduction to Solid State Physics' - Advanced Topic B - 4th. Ed. - 1971.
- [24]- ISRAELACHVILI J. N., Intermolecular and Surface Forces Ch. 2 - 2nd. Ed., 1992.



Apêndice A

A – 1 Relação de van der Waals e parâmetros^(23,24)

A distâncias interatômicas muito pequenas, as nuvens de elétrons se superpõem dando origem a forças repulsivas fortes que determinam quanto dois átomos ou moléculas podem se aproximar um do outro. Estas forças repulsivas são algumas vezes referidas como—repulsão de troca, repulsão de núcleo rígido, repulsão estérica ou—para íons— repulsão de Born, e são caracterizadas por terem alcance muito pequeno e crescimento muito aguçado quando duas moléculas se aproximam. Estritamente, elas pertencem ao domínio da mecânica quântica e infelizmente não existe uma equação geral para descrever suas dependências com a distância. Um número de funções potencial, empíricas tem sido introduzido ao longo dos anos, todas as quais parecem satisfatórias até onde elas apresentem uma repulsão crescente para aproximações pequenas.

Se átomos são considerados como esferas rígidas, i.e., incompressíveis, a força repulsiva subitamente torna-se infinita a uma dada separação interatômica. Este modelo simples reflete a observação que quando átomos diferentes empacotam-se em líquidos e sólidos eles normalmente comportam-se como esferas rígidas ou ‘bolas de bilhar’, de raios fixos, característicos de cada átomo. Definido desta forma o raio de um átomo (isolado ou covalentemente ligado) ou molécula esférica é chamado raio de esfera rígida ou raio de empacotamento de van der Walls. Resultados obtidos de estudos em sólidos, especialmente cristais com difração de raios x ou nêutrons e dados de solubilidade de gás, viscosidade e autodifusão em líquidos, normalmente fornecem valores que diferem poucos pontos percentuais. Os raios de empacotamento de van der Walls, da maioria dos átomos e moléculas pequenas jazem entre 1 e 2 Å.



Conceitos similares aplicam-se a íons em cristais iônicos, onde o raio de empacotamento característico é referido como raio reduzido do íon. O raio reduzido do íon é bastante diferente do raio do íon hidratado de um íon na água. Note que ânions são geralmente maiores que cátions; isto porque eles ganharam elétrons antes de perdê-los o que promove uma repulsão adicional que promove inflação do íon.

Também é reconhecido que a distância entre os centros atômicos de dois átomos unidos por uma ligação covalente pode ser expressa como a soma de seus raios de ligação covalente. Raios de ligação covalente única são normalmente 0.8 Å mais curtos que os raios não ligados (van der Waals)

Considerando tanto os raios covalentes como os de van der Waals de átomos individuais em uma molécula e os ângulos de ligação entre eles, nós podemos estabelecer os raios de van der Waals efetivos de uma molécula. Este conceito é estritamente válido para moléculas pequenas e aproximadamente esféricas, tal como CH_4 . Bondi (1968) descreve procedimentos para calcular os raios efetivos de van der Waals de moléculas e grupos de moléculas. Para moléculas muito assimétricas, que não podem ser consideradas mesmo como 'quase-esferas', devemos considerar suas dimensões de van der Waals ao longo de diferentes eixos moleculares. Por exemplo, em alcanos o raio efetivo do tipo-cilindro da cadeia parafina é cerca de 2 Å, enquanto seu comprimento total é 1.27 Å por ligação $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ ao longo da cadeia adicionando-se ~ 2.0 Å para cada grupo hemisférico CH_3 em cada terminal.

Existem muitos métodos diferentes para medir os raios de átomos e moleculares. Estes incluem dados espectroscópicos e PVT de gases, dados de solubilidade, viscosidade e difusão tanto em gases quanto em líquidos, dados sobre compressibilidade, difração de elétrons, nêutrons e raios x em líquidos e sólidos. Os valores para dimensões moleculares deduzidos destes diferentes métodos podem diferir



cerca de 30%. Isto ocorre porque cada método mede uma propriedade ‘ligeiramente’ diferente. Assim, raios moleculares, $\sigma/2$, são determinados do coeficiente b da equação de estado de van der Walls

$$\sigma/2 = 4.63 \cdot b^{1/3} \quad (\text{A-1})$$

onde σ é a distância de aproximação máxima, sendo b dado por meio do seguinte raciocínio abaixo.

Inicialmente vamos ver como o potencial de interação de van der Walls entre duas moléculas pode ser relacionado com as constantes a e b na equação de estado de van der Walls:

$$(P + a/V^2)(V - b) = R \cdot T \quad (\text{A-2})$$

Vamos considerar as moléculas como esferas rígidas, com diâmetro σ , sendo que o par tem energia de interação dada por (Ver: 1. - ‘c’; ver também; -2. - Jacob N. Israelachvili Ch. 2 - 1992 – 2rd. Ed., Intermolecular and Surface Forces):

$$W(r) = -3 \cdot \alpha_0^2 \cdot h \cdot v / [4 \cdot (4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0)^2 \cdot r^6] = -C/r^6 \text{ para } r > \sigma$$

$$W(r) = \infty \text{ para } r < \sigma \quad (\text{A-3})$$

A constante a é dada por:

$$a = 2 \cdot \pi \cdot C / (n-3) \sigma^{n-3} = 2 \cdot \pi \cdot C / \sigma^3,$$

para $n = 6$. Este valor, entretanto, foi derivado para o caso em que a equação de van der Walls está expressa em termos de parâmetros moleculares (Eq. A-2). Uma vez que $v = V/N_0$ quando V é o volume molar, temos:

$$a = 2 \cdot \pi \cdot N_0^2 \cdot C / 3 \cdot \sigma^3. \quad (\text{A-4})$$

O coeficiente C da força de dispersão de London está, portanto relacionado com a constante ‘ a ’ de van der Walls por:

$$C = 3 \cdot \sigma^3 \cdot a / 2 \cdot \pi \cdot N_0^2 \quad (\text{A-5})$$



A constante 'b' é obtida a partir do volume não disponível para as moléculas se moverem dentro do volume excluído por mol. Uma vez que uma molécula não pode se aproximar mais do que σ da outra, o volume excluído é $(4/3) \pi \cdot \sigma^3$ ou, $(2/3) \pi \cdot \sigma^3$ por molécula. Assim,

$$b = (2/3) \pi \cdot \sigma^3 \cdot N_0 \quad (\text{A-6})$$

por mol, o qual é quatro vezes o volume molar das moléculas. O diâmetro molecular, portanto é dado por:

$$\sigma = (3b/2\pi N_0)^{1/3} \quad (\text{A-7})$$

Combinando a equação acima com (A-5) nós finalmente obtemos para a constante de interação:

$$C = 9ab/4\pi^2 N_0^3 = 1.05 \cdot 10^{-76} ab \text{ J} \cdot \text{m}^6 \quad (\text{A-8})$$

Onde a está em $\text{dm}^6 \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-2}$ e b em $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. A tabela A – 1 mostra como é boa a concordância para as moléculas, exceto para a maior molécula CCl_4 , a qual deve ter uma interação mais forte do que a equação de London pode determinar.

Tabela A – 1: Diâmetros moleculares para moléculas não polares esféricas

Moléculas interagentes	$\sigma(\text{\AA})$
Ne – Ne	3,08
Ar – Ar	3,76
$\text{CH}_4 - \text{CH}_4$	4,00
$\text{CCl}_4 - \text{CCl}_4$	5,50
Xe – Xe	4,32

Obs: As constantes 'a' e 'b' de van der Waals foram tiradas do Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press 56Ed.

A – 2 Um modelo simples para a interação de London – van der Waals^(23,24)

Consideremos dois osciladores harmônicos lineares idênticos, separados por uma distância R, sustentando cargas $\pm e$ com separações x_1 e x_2 , como na figura A – 1. As partículas oscilam ao longo do eixo x. Designemos os momentos lineares $m(dx_1/dt)$ e $m(dx_2/dt)$ como p_1 e p_2 respectivamente. Então o Hamiltoniano do sistema não perturbado, é:

$$H = (1/2m)p_1^2 + (1/2)\beta x_1^2 + (1/2m)p_2^2 + (1/2)\beta x_2^2 \quad (A-9)$$

Cada oscilador desacoplado tem frequência de ressonância dada por:

$$\omega_0 = (\beta/m)^{1/2} \quad (A-10)$$

apropriado para um oscilador harmônico simples.

Seja H_1 a energia de interação dos dois osciladores. A geometria está mostrada na figura A – II – 1. A coordenada internuclear é R. Então:

$$H_1 = e^2/R + e^2/(R+x_1-x_2) - e^2/(R+x_1) - e^2/(R-x_2) . \quad (A-11a)$$

Na aproximação $|x_1|, |x_2| \ll R$, temos:

$$H_1 \approx - 2e^2 x_1 x_2 / R^3 . \quad (A-11b)$$

O Hamiltoniano total pode ser diagonalizado pela transformação dos modos normais:

$$x_s \equiv (x_1+x_2)/\sqrt{2} ; \quad x_a \equiv (x_1-x_2)/\sqrt{2} \quad (A-12)$$

ou, resolvendo para x_1 e x_2 ,

$$x_1 = (x_s + x_a)/\sqrt{2} ; x_2 = (x_s - x_a)/\sqrt{2} \quad (\text{A-13})$$

Os subscritos 's' e 'a' designam modos de vibração simétrico e anti-simétrico respectivamente. Adicionalmente, temos os momentos p_s e p_a associados com estes modos.

$$p_1 \equiv (p_s + p_a)/\sqrt{2} ; p_2 \equiv (p_s - p_a)/\sqrt{2} \quad (\text{A-14})$$

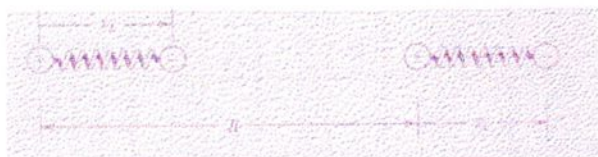


Figura A – 1: Coordenadas dos dois osciladores

O Hamiltoniano total $H_0 + H_1$ após as transformações (A-13) e (A-14) é:

$$H = [p_s^2/2m + (1/2)(\beta - 2e^2/R^3)x_s^2] + [p_a^2/2m + (1/2)(\beta - 2e^2/R^3)x_a^2] \quad (\text{A-15})$$

As duas frequências dos osciladores acoplados podem ser encontradas por inspeção de (A-15), daí;

$$\omega = [(\beta \pm 2e^2/R^3)/m]^{1/2} \approx \omega_0[1 \pm (1/2)(2e^2/\beta R^3) - (1/8)(2e^2/\beta R^3)^2 + \dots] \quad (\text{A-16})$$

com ω_0 dada por (A-10).

A energia do ponto zero é dada por $(1/2)\hbar(\omega_s + \omega_a)$; a soma é rebaixada devido a interação pela quantidade

$$\Delta U = (1/2)\hbar(\Delta\omega_s + \Delta\omega_a) = -\hbar\omega_0(1/8)(2e^2/\beta R^3)^2 \quad (\text{A-17})$$

Esta é uma interação atrativa que varia com a sexta potência negativa da separação dos dois osciladores.

A polarizabilidade de um oscilador é:

$$\alpha \equiv \text{momento de dipolo elétrico/intensidade de campo elétrico} = e^2/\beta \quad (\text{A-18})$$

pelo argumento do capítulo 13 de 'Introduction to Solid State Physics' - Charles Kittel

- 4th. Ed. - 1971; assim:

$$\Delta U = - \hbar \omega_0 a^2 / 2R^6 = - C/R^6 \quad (\text{A-19})$$

onde $C \equiv \hbar \omega_0 a^2 / 2$. Esta é a interação de van der Walls e $R \equiv r$ é a distância de máxima aproximação.



Apêndice B

Comandos do Maple para cálculo do estiramento médio dos pares de base

Agora vamos fazer a integração (85), com o auxílio do sistema Maple 7.

```
e := ((sqrt(2)*a)^(1/2)*(2*d)^(d-1/2)*exp(-d*exp(-sqrt(2)*a*y))*exp(-(1/2)*sqrt(2)*a*
y)^2)/(GAMMA(2*d-1)^(1/2));
d := (b/a)*(2*k*J)^(1/2); (Fizemos D=J; por razões técnicas do sistema Maple 7).
b := 1/(k_B*T);
k_B := 86.17* 10^(-6);
a := 4.45;
J := 0.04;
k := 0.06;
d := 127.7584156/T*2^(1/2)
• e := «sqrt(2)*a(1/2)*(2*d)^(d-1/2)*exp(-d*exp(-sqrt(2)*a*y))*exp(-
(d1/2)*sqrt(2)*a*y)^2)/(GAMMA(2*d-1)^(1/2);
• d :=  $\beta (2kJ)^{1/2}$ ;
•  $\beta := 1/(k_B T)$ ;
•  $k_B := 0.00008617$ ;
• a := 4.45;
• J := 0.04;
• k := 0.06;
• d :=  $127.7584156 \sqrt{2}/T$ ;
• e :=  $2.1095^{1/4} (255.516 \sqrt{2}/T)^{(127.7584156 \sqrt{2}/T - 1/2)} \exp[-127.7584156 \sqrt{2}/T * e^{(4.45 \sqrt{2} y)}] * [e^{[-4.45(127.7584156 \sqrt{2}/T - 1/2) - 2 Y]}]^2$ 
• for T from 100 to 361.23 by 10 do ( [T, evalf( int( e, y=0..18) )] ) Qd;
with(plots):
• pointplot( [[100, .1988992945], [110, .2163692006], [120, .2341990711],
[130, .2524884879], [140, .2713409295], [150, .29086732], [160, .3111897208],
[170, .3324454852], [180, .35479224169646], [190, .3784141122], [200, .4035297705], [210, .4304031701], [220, .4593581977], [230, .4907991807], [240, .5252403765], [250, .56334
9530063], [260, .6060143639], [270, .6544478430], [280, .7103622970], [290, .7762730336
], [300, .8560635741], [310, .9561295217], [320, 1.087964503], [330, 1.2749684648], [340, 1
.574209783], [350, 2.145488020], [360, 2.547204681]], symbol=point, color=black, title
= 'ym');#
```

Apêndice C

Reação em cadeia de Polimerase (PCR) – Aplicações Clínicas em Neurologia*

Prof. Leopoldo Pires**

RESUMO: O autor faz um breve histórico sobre a descoberta do DNA (ácido desoxi-ribonucleico) e dos princípios que regem a técnica da reação em cadeia de polimerase. São descritas as principais fases desta reação e colocados em destaque sua utilização em medicina, principalmente em neurologia.

PALAVRAS CHAVE: Reação em Cadeia de Polimerase, PCR.

1. INTRODUÇÃO:

Desde 1953, quando Watson e Crick elucidaram a estrutura do DNA, que se conhece a molécula e sua composição, sequência de quatro bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina e Guanina) unidas por pontes de hidrogênio e com a formação da "dupla hélice" formando moléculas complementares onde adenina (A) liga-se apenas com timina (T) e citosina (C) apenas com guanina (G) ^(3,4,5,6). Posteriormente, Com a evolução tecnológica criaram-se várias técnicas para o estudo do código genético, culminando com o "projeto Genoma Humano" recentemente concluído. Assim abriu-se um horizonte de possibilidades para o estudo da genética humana e de outros seres vivos, assim como da interação entre espécies e, inclusive da possibilidade de "criar" novas espécies através da manipulação gênica.

Em medicina esta evolução abriu vasto campo de investigação, desde o conhecimento das doenças geneticamente determinadas à identificação de agentes infecciosos, que antes "escapavam" dos métodos utilizados (bacterioscopia, cultura, etc...) ^{4,6,7,8}

2- Princípios da Reação em Cadeia de Polimerase

A molécula de DNA é bastante estável, mantendo as ligações Adenina-Timina e Guanina-Citosina através de pontes de Hidrogênio, porém quando aquecida a 94° C rompem-se as pontes de hidrogênio e separam-se as duas "hélices". O oposto ocorre quando se resfria a molécula a (30 a 65° C) e a mesma volta a se "ligar" voltando a sua forma original ^{2,3,4,10,12,14}.

No final dos anos 80, Kary Mullis descreveu a técnica que revolucionaria o estudo do DNA, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction). Ao contrário das técnicas anteriormente utilizadas a nova técnica era bastante rápida e de execução simplificada ^{3,4}.



A enzima Polimerase adiciona nucleotídeos na sequência de uma molécula matriz, rota pelo aquecimento. Esta enzima necessita de um ponto de apoio (sequência de nucleotídeos já ligados a esta molécula) para iniciar o sequenciamento. A esta sequência de 20 a 30 nucleotídeos que vão se ligar a cada uma das hélices, delimitando o fragmento a ser copiado, dá-se o nome de PRIMER. A molécula de DNA com suas "hélices" separadas e cada uma com seu primer específico, serão copiadas e conseqüentemente duplicadas^{1,2,3,10,12,14}.

Inicialmente utilizava-se o polimerase de *Escherichia coli*, porém esta era inativada pelas altas temperaturas necessárias à reação e em cada ciclo era necessário colocar nova amostra de polimerase. Este procedimento tornava a reação mais demorada e dispendiosa. A forma encontrada para a resolução deste problema foi a utilização da polimerase de uma bactéria que se desenvolvia em fontes termais (temperaturas em torno de 74° C) e que a polimerase permanecia estável em temperatura de 94° C, a *Thermus aquaticus*, e devido a isto a polimerase utilizada chama-se Taq polimerase^{1,3,4,6,10,12,14}.

3- Fases da Reação em Cadeia de Polimerase

1ª Fase: Aquecimento – Desnaturação do DNA – 1 a 5 minutos

Aquecimento da solução a 94° C

2ª Fase – Resfriamento a 50 a 65° C - Hibridização – 90 segundos

Nesta fase há acoplamento dos Primers nos locais pré-determinados. Devido ao resfriamento, a molécula de DNA tende a se ligar novamente (Formação de dupla hélice), mas como existe no meio grande quantidade de primers, estes acoplarão nos sítios específicos, constituindo assim o local para iniciar o sequenciamento dos nucleotídeos, que ocorrerá na 3ª fase,

3ª Fase – Reaquecimento a 72° C – Ação da Taq Polimerase – Duplicação do DNA – 2 a 5 minutos

Reaquece-se a solução a 72° C, pois esta é a temperatura ideal para a atuação da Taq polimerase, que a partir do primer inicia a adição do nucleotídeo correspondente no sequenciamento criando moléculas complementares (sempre A com T e C com G). Após este processo o fragmento de DNA foi duplicado.

Esta sequência poderá ser repetida várias vezes e em cada ciclo haverá duplicação do DNA. No final de 5 horas teremos milhares de cópias da molécula inicial^{1,3,4,5,8,10,12,14}.

4- Utilização da PCR em Medicina

Baseados no que vimos anteriormente podemos iniciar os estudos da aplicação da técnica da PCR em medicina. Note que a reação possibilita a cópia, teoricamente, a partir de uma única molécula de DNA, o que possibilita o diagnóstico partindo de amostras mínimas e com grau de especificidade em torno de 99,9%^{3,4,7,8}.

Dentre as utilizações podemos citar:

a. Uso em Medicina Legal e Forense

Para a determinação de paternidade e identificação de criminosos a partir de amostras recolhidas na cena do crime (gotas de sangue, esperma, fios de cabelos com bulbos capilares, etc.), e também para os casos de autorização de abortos terapêuticos baseados na identificação de alterações genéticas^{4,5,6,10,13}.



b. Diagnóstico e Estudo de Doenças Genéticas

Com a utilização desta técnica podemos fazer estudos para identificar as alterações genéticas que levam a determinadas doenças e identificar o defeito metabólico conseqüente desta alteração, possibilitando novas abordagens terapêuticas. Permite também identificar os casos de homozigóticos e heterozigóticos, diferenciando aqueles que desenvolverão a doença daqueles que serão portadores da alteração genética podendo ser feito inclusive em líquido amniótico, possibilitando a identificação intra-útero destas alterações. Vale também para aquelas doenças, que uma vez identificadas nos orienta a medidas terapêuticas e ambientais, como dietas por exemplo, podendo assim ter seus efeitos minimizados ou mesmo evitados (Fenilcetonúria p/ex) e também para aconselhamento genético evitando a transmissão das alterações para as gerações futuras. Com a descrição do genoma humano vários estudos estão em andamento e dentre eles podemos citar, entre outros, as hemoglobinopatias, identificação de tumores e de micrometástases (Tumor de próstata p/ex) e especificamente em neurologia as distrofias musculares, coreia de Huntington e a Síndrome do X-Frágil^{1,2,3,4,6,10,11,12,14}.

c- Diagnóstico das Doenças Infecciosas e Parasitárias

O diagnóstico etiológico das doenças infecciosas sempre foi um desafio na prática médica, pois deste depende o tratamento adequado e conseqüentemente a redução da morbimortalidade. Com a técnica da PCR houve uma otimização deste processo, pois partindo de pequenas quantidades de DNA na amostra, podemos identificar com grande precisão o agente etiológico. Devemos lembrar que nestes casos dependemos do uso de primers específicos para cada agente a ser investigado. Naqueles casos em que o agente a ser estudado apresenta RNA (HIV p/ex) utiliza-se uma enzima com atividade da transcriptase reversa produzindo-se uma molécula de DNA a partir da molécula de RNA original e posteriormente aplica-se a reação em cadeia de polimerase para obter inúmeras cópias do material. Teoricamente podemos identificar qualquer patógeno a partir do seu DNA, dentre os relatados na literatura podemos citar:

VIRAIS: ^(4,7,10)

Hepatite HCV (qualitativo e quantitativo), Hepatite HBV, Hepatite HGV

Citomegalovírus (CMV qualitativo e quantitativo)

Herpes simples e Herpes zoster

Epstein-barr

Enterovírus e adenovírus

JC vírus

Sarampo, caxumba, rubéola, parvovírus

Papiloma vírus (HPV)

HIV (qualitativo e quantitativo – carga viral)

BACTERIANOS ^(4,7,10)

Tuberculose

Legionela

Meningococo, Pneumococo e Haemophilus

Listeria

Chlamydia trachomatis

Leptospira
Helicobacter pylori
OUTROS PATÓGENOS:^(4,7,10)

Toxoplasma gondii,
Mycoplasma pneumonia
Pneumocystis carinii

CONCLUSÃO:

Como vimos anteriormente a técnica da PCR proporcionou grandes avanços na prática médica, porém ainda é um método de alto custo devendo ser utilizado naqueles casos em que a sua aplicação é fundamental para o diagnóstico. Os exames complementares, por mais sofisticados que sejam, não substituem a anamnese e o exame físico e, no caso da PCR, estes orientarão quais primers serão utilizados para a confirmação diagnóstica.

BIBLIOGRAFIA

- 1-<http://falcon.cc.ukans.edu/~jbrown/pcr.html> – **BROW, J.C.** - What the heck is PCR - 02/09/2000
- 2-<http://www.sciam.com/2000/0700issue/0700amsci.html> – **CARLSON, S.** – SCIENTIFIC AMERICAN - Gene Machine – 02/09/2000
- 3-<http://www.criesp.com.br/inform/injan97.htm> – **CRIESP** – Diagnóstico por Biologia Molecular – 10/09/2000
- 4-**FARAH, S.B.** – DNA, Segredos e Mistérios. São Paulo: SARVIER, 1997
- 5-http://www.bionet.hpg.com.br/dna_e_rna.html – **FERRACINI, D.A.** - DNA e RNA – 10/09/2000
- 6-<http://www.genomic.com.br/jur/paternidade/item05.htm> – **GENOMIC** – Engenharia Molecular - Os Exames de DNA – 31/08/2000
- 7-<http://www.dnareference.com/serviços/diag.htm> – **Laboratório DNA Reference** – Diagnóstico de Infecções - 31/08/2000
- 8-<http://www.openline.com.br/~vandique/pcr.htm> – **Laboratório Dr. Vandique** - Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) – 01/09/2000
- 9-<http://www.ib.usp.br/evolucao/QTL/marcadores.html> – **MATIOLI, S.R.** – Introdução ao Estudo dos QTLS (Locos de Caracteres Quantitativos) - Marcadores Moleculares – 10/09/2000
- 10-<http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/rdna/pcr.html> – Polymerase Chain Reaction – Xeroxing DNA – **National Center for Human Genome Research** – 29/08/2000
- 11-<http://www.fapesp.br/genes.htm> – **Notícias FAPESP** - USP Identifica Novos Genes Causadores de Doenças – 31/08/2000
- 12-<http://www.purchase.net/cells/pcr.htm> — **PURCHON, N.D** - Polymerase Chain Reaction. – 29/08/2000
- 13-http://www.uniclinica.com.br/boletin/janeiro99_02.htm – **UNICLINICA** – Boletim Médico Mensal – **Raskin, S.** - PCR na Realização de Testes de Paternidade em DNA – 31/08/2000
- 14-http://accessexcellence.org/LC/SS/PS/...PCR_technology.htm – **VEILLEUX, C.** – PCR Technology – 02/09/2000.

- Trabalho realizado no Serviço de Neurologia do Hospital Universitário da UFJF.

**** Prof. Adjunto de Clínica Neurológica. Mestre em Medicina.**



