

TRANSFERÊNCIA DE GENES EM BACTÉRIAS

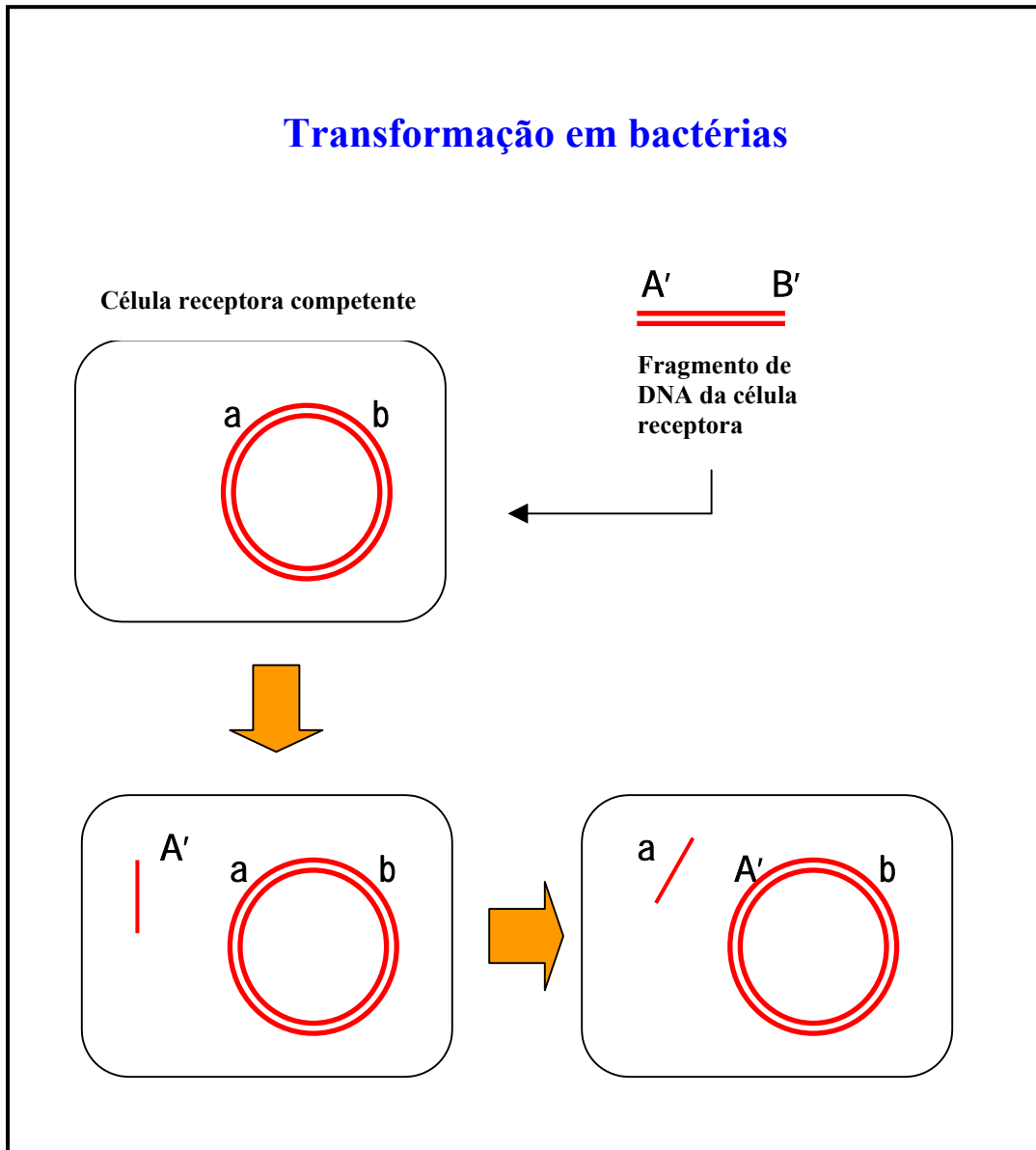
❖ “SEXO BACTERIANO”

Bactérias podem trocar ou transferir DNA entre elas por três diferentes vias. Em todos os casos, as células que fornecem o DNA são chamadas de DOADORAS e as que recebem são denominadas RECEPTORAS. O DNA do doador é incorporado ao DNA do receptor por recombinação. Se a recombinação envolver um alelo diferente daquele presente no gene do receptor, o genoma e o fenótipo do segundo serão alterados. As três formas de transferência de DNA entre bactérias são: (1) **TRANSFORMAÇÃO**, (2) **CONJUGAÇÃO** e (3) **TRANSDUÇÃO**.

❖ TRANSFORMAÇÃO

O fenômeno da **transformação** envolve um processo no qual o DNA (de uma célula doadora) livre no meio é tomado por uma segunda (receptora), resultando em alterações genotípicas nessa. Para a célula conseguir captar o DNA é necessário que a mesma encontre-se em estado de **competência** cálcio-dependente. O DNA adere-se à face externa da membrana celular bacteriana, quando então, *DNA binding proteins* e endonucleases clivam esse DNA em fragmentos de 6.000 – 8.000 bp. Algumas exonucleases clivam as pontes de hidrogênio estabelecidas entre os pares de base e separam as duas metades da dupla fita, para que somente uma entre na célula. Uma vez no citoplasma, o DNA alienígena ligado às *DNA binding proteins* (que evitam a digestão pelas DNAses) encontra o cromossomo da célula receptora ou um plasmídeo e ocorre a recombinação em **sítios de homologia**. Esse fenômeno pode ser observado em organismos gram-positivos e em gram-negativos.

Transformação em bactérias



❖ TRANSDUÇÃO

O segundo meio de transferir DNA entre organismos envolve a mediação de vírus. Como você sabe, vírus bacterianos são chamados de **bacteriófagos**, ou simplesmente **fagos**, pela maioria dos microbiologistas.

Dois cientistas, F. Twort e F. d'Herelle, descobriram os bacteriófagos independentemente, em 1915 e 1917. O termo fago significa “**que come**”.

Os fagos podem ser detectados de duas maneiras:

1. Em ágar, formam “buracos” na camada confluenta de bactérias, conhecidos como **placas** que podem variar de 1 a 3mm em diâmetro, dependendo do fago e das condições de cultivo. Em condições padronizadas, o diâmetro das placas é uma característica definida por cada fago.

2. Em culturas líquidas, a adição de fagos geralmente causa um **desaparecimento** das formas viáveis de bactérias em poucos minutos.

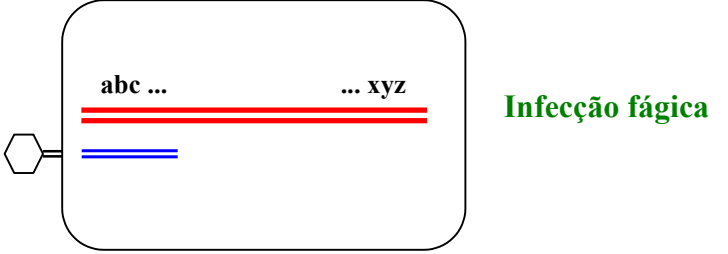
Um observador mais atento poderia questionar quanto ao emprego desses fagos na terapêutica de infecções bacterianas. Porém, tal procedimento é ineficiente, uma vez que a resposta do **sistema imune** acaba por inativar o fago. Outro fator que inviabiliza tal utilização é a **elevada especificidade** que eles apresentam em relação as bactérias-alvo que irão atacar e destruir. Tal especificidade fez dos fagos ferramentas úteis na identificação de espécies bacterianas que causam infecções, uma vez que a fonte da infecção foi determinada.

A capacidade dos fagos de carrear DNA entre bactérias foi descoberta em 1952. Pesquisadores que estudavam a conjugação observaram que mesmo quando interpunham uma membrana que evitava o contato físico entre elas, ocorria **transferência de genes** e como essa transferência não era evitada por DNases, tal fenômeno não poderia ser **transformação**. Foi proposto então que esse DNA estaria protegido contra a ação da enzima. Mais tarde, foi descoberto que bacteriófagos infectando uma das linhagens podia transferir segmentos do ácido nucleico para a outra linhagem. O capsídeo protéico que envolve o DNA viral (e os segmentos do bacteriano) prevenia a digestão enzimática. Esse processo de transferência de DNA mediado por fagos foi então denominado **transdução**.

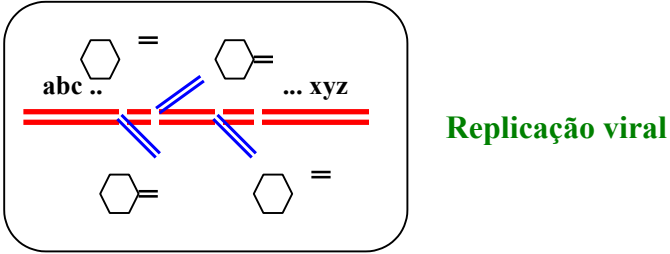
A transdução ocorre da seguinte maneira:

1. Um fago infecta uma bactéria susceptível injetando seu DNA.
2. O DNA fágico induz a célula hospedeira a converter todo seu metabolismo para a síntese de novos fagos.
3. Finalmente, ao término do ciclo lítico do fago, vários componentes das partículas virais, no citoplasma, são montados e a célula é lisada, liberando novos fagos infectivos.
 - Durante o processo de montagem, alguns **erros ocasionais** ocorrem e grandes segmentos de DNA bacteriano acabam por se incorporar no genoma do novo fago, em detrimento de porções do DNA do próprio vírus. Esses novos fagos são denominados **fagos defectivos**.

Transdução em bactérias



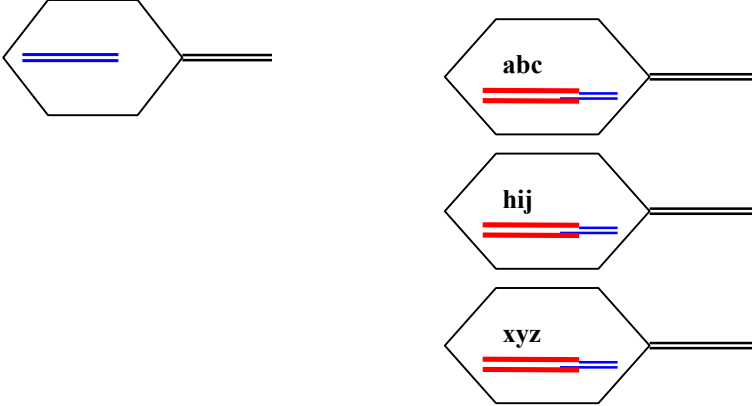
incubação



lise

(999/1000)

(1/1000)



Contudo, esses fagos defectivos ainda apresentam a capacidade de injetar seu DNA numa segunda bactéria. Uma vez que esses fagos, quase que exclusivamente, apresentam DNA somente da primeira bactéria, a infecção propriamente dita não ocorre.

A **recombinação** pode ocorrer entre os segmentos de DNA da primeira célula e o DNA da nova célula, sendo que **alguns alelos** carreados pelo fago defectivo podem tornar-se incorporados no novo genoma, com **alteração do seu genótipo**.

Pergunta: “Se esse evento é tão raro, como podemos detectar a ocorrência?”

Resposta: Isso pode vai depender do **número de fagos e células empregados**. Uma suspensão *stock* de fagos pode conter 10^{10} partículas fágicas por mililitro e uma cultura bacteriana 2×10^9 células por mililitro. Então, se considerarmos que pode ocorrer 1 transdução a cada 1000 infecções, tem-se que 2 em até 10^8 infecções podem incorrer numa transdução.

❖ CONJUGAÇÃO

❖ PLASMÍDEOS

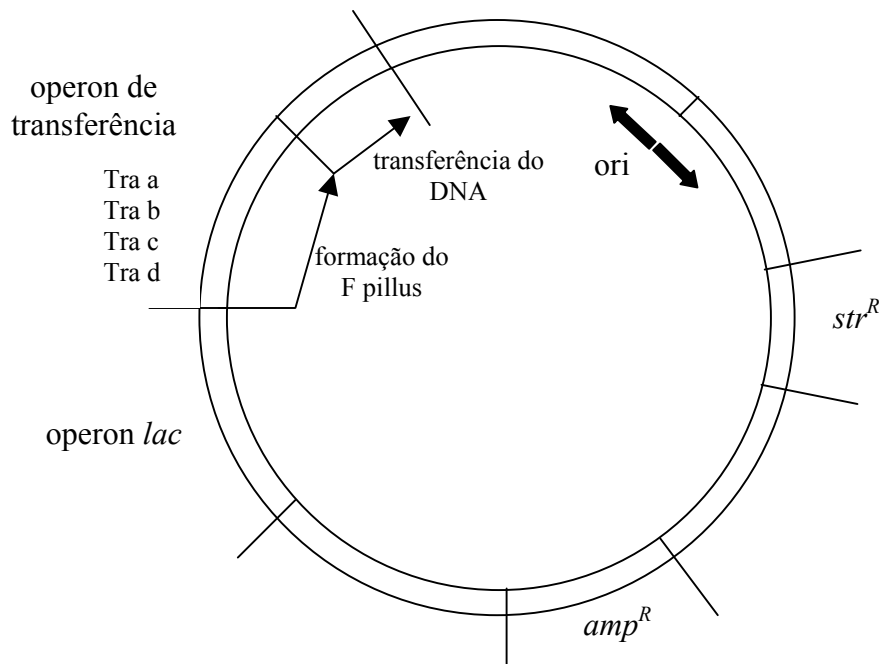
Antes de se discutir o mecanismo de troca de DNA por conjugação, é necessária a compreensão do que são **plasmídeos**. Plasmídeos são melhor entendidos, se os considerarmos como sendo **mini-cromossomos** que são compostos de DNA disposto em **moléculas circulares** que variam em extensão, mas cuja maioria contém entre 1.000 e 25.000 pares de base, contra os 4.000.000 bp do genoma cromossômico. Esses segmentos **replicam-se de forma autônoma**, e comumente, são encontradas várias cópias em uma única célula. Ainda, uma célula pode albergar diferentes plasmídeos ou conter nenhum.

Plasmídeos geralmente carregam genes que não são essenciais para a sobrevivência da célula, exceto em circunstâncias especiais. Por exemplo, muitos plasmídeos carregam genes para **resistência à antibiótico**, e quando esses plasmídeos estão presentes em uma célula, essa se torna não afetada por determinados antibióticos, mas se o plasmídeo e seu(s) gene(s) de resistência são perdidos (cura plasmidial), a célula hospedeira torna-se sensível a um(s) dado(s) antibiótico(s). Alguns plasmídeos carregam genes de resistência à vários antibióticos, fazendo deles patógenos muito perigosos. Em outro caso, plasmídeos denominados **plasmídeos de virulência**, carregam **genes de virulência** que aumentam a possibilidade da célula bacteriana em

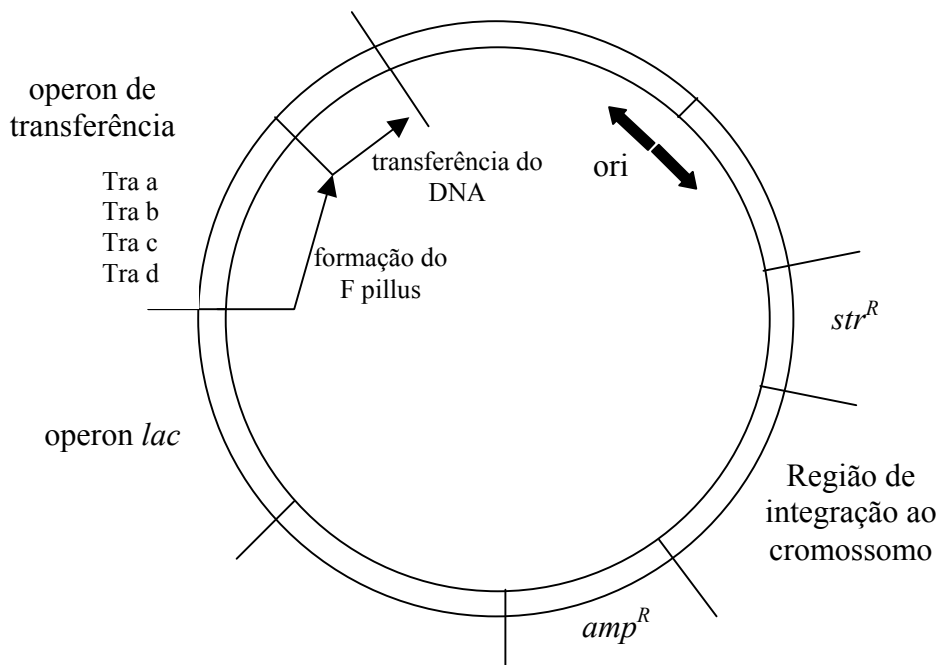
causar doenças. Isso é, uma bactéria portando um plasmídeo com genes de virulência é capaz de causar uma determinada doença, mas quando esse plasmídeo é perdido, a mesma bactéria torna-se incapaz de promover aquela patologia. Um bom exemplo de doença provocada por genes de virulência presentes em plasmídeos é a **Síndrome Urêmico-Hemolítica** provocada pela cepa **O157:H7** de *Escherichia coli* que desenvolve-se em alimentos cárneos e que quando ingerida induz a um quadro de falência de múltiplos órgãos.

Outros plasmídeos carregam genes que protegem a célula bacteriana portadora contra a ação de substâncias **deletérias** como mercúrio e cobre, ou ainda, carregam genes que tornam possível a metabolização de substratos não usuais como gasolina.

Uma questão naturalmente nos advém. **Qual o papel desses plasmídeos no esquema evolucionário?** A explicação corrente é de que plasmídeos constituem **um conjunto adicional de alelos** que aumentam efetivamente a diversidade gênica de uma população bacteriana. Cabe lembrar que o genoma de procaríotos carrega somente informação para 1.000 – 5.000 genes e que uma maior variedade aumentam as chances de **sobrevivência** de uma bactéria num meio adverso.



Esquema de um plasmídeo F



Esquema de um plasmídeo Hfr

❖ CONJUGAÇÃO

A descoberta da **conjugação**, a *habilidade das células bacterianas em transferir DNA por contato físico*, como forma de troca de material genético, no início da década de 1950, surpreendeu alguns cientistas devido à sua similaridade antropomórfica de troca de genes. Desde sua descoberta, a troca conjugacional de DNA em bactérias tem sido documentada e mostrada como sendo a forma mais comum e promíscua. Inicialmente, acreditava-se que a conjugação fosse ocorrer somente entre bactérias de mesma espécie ou entre espécies muito relacionadas, mas a observação mais apurada mostrou que a conjugação ocorre também entre espécies não relacionadas.

As condições básicas para a conjugação são:

- ❖ Células doadoras devem carrear ao menos um único plasmídeo que contenha um grupo de genes que possibilite a conjugação. Esses plasmídeos são conhecidos como **plasmídeos sexuais** ou de **fertilidade** e células que os possuem são chamadas de células **macho** ou **F+**, ao passo que aquelas que perdem ou não possuem tal

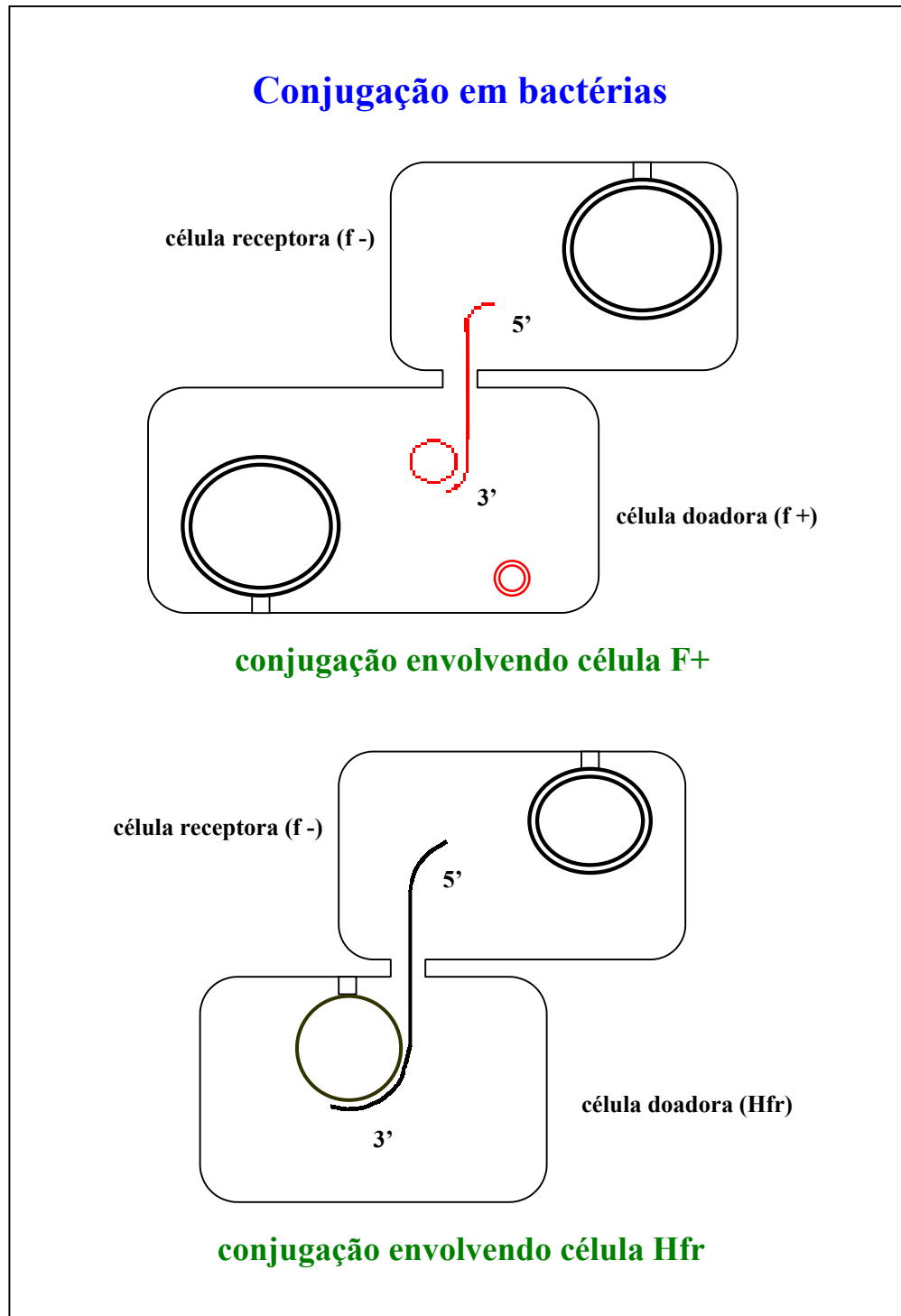
plasmídeo passam a ser chamadas de células **fêmeas** ou **F-**. Os genes contidos nesses plasmídeos são responsáveis pela síntese de *pili* proteicos especiais longos, finos e tubulares, em cujas extremidades livres possuem receptores que ligam-se firmemente à ligantes moleculares nas paredes de células F-.

- ❖ Após a união de duas células com **reação sexual** oposta através desses *pili*, essas tornam-se unidas por meio de uma “**ponte conjugativa**” que passa a permitir a continuidade do conteúdo citoplasmático nessas duas células.
- ❖ Uma enzima especial cliva uma das fitas do DNA do doador F+ em um único sítio e uma recém-sintetizada fita de DNA passa através da ponte conjugativa para o interior da célula receptora F-. Essa fita é convertida numa forma de fita dupla que esta apta a sofrer permuta com regiões de homologia no DNA da célula F-, por recombinação. A forma mais comum de conjugação envolve a transferência de plasmídeos, de uma célula para outra, e se o plasmídeo transferido for um plasmídeo de fertilidade, a **célula F- torna-se uma F+** que imediatamente começa a combinar-se com outras células F-. Alguns plasmídeos F+ conseguem **incorporar-se no DNA genômico** da célula receptora transformando essa numa **célula Hfr** (*high frequency recombination*).

❖ **SUPERBACTÉRIAS**

A transferência conjugativa de plasmídeos de resistência a antibióticos entre bactérias é um dos maiores problemas encontrados hoje, no que tange a terapêutica de infecções. No caso de alguns patógenos, temos atualmente **apenas um antibiótico eficaz** (Vancomicina) reservado ao uso contra eles e contra outros resistentes a quase todos antibióticos existentes. Isso é, essas **SUPERBACTÉRIAS** contêm plasmídeos carreando genes de resistência contra **todos** antibióticos disponíveis. Alguns dos maiores focos de transferência desses plasmídeos são os hospitais. Esse é um excepcional exemplo de *evolution-in-action*. Uma vez que pessoas infectadas com patógenos são **concentradas** em hospitais, e que todas as formas de antibióticos são extensivamente usadas para tratar essas infecções, as chances de que um plasmídeo contendo genes para a resistência a antibióticos seja selecionado e transferido para outras bactérias são relativamente altas. Mais, a possibilidade de uma bactéria receber um desses plasmídeos e já ter outros plasmídeos com genes de resistência contra outros antibióticos é estatisticamente alta.

Outras atividades, como alimentar o gado com antibióticos para aumentar a produção de carne ou para aumentar seu tempo de preservação no comércio contribuem para a seleção e subsequente dispersão desses plasmídeos de resistência.



OBJETIVO DA AULA:

Apresentar ao aluno de Odontologia os conceitos básicos de transferência de genes entre bactérias e a importância desse fenômeno, quando o mesmo envolve genes de importância médica.

QUESTÕES:

1. Explique, detalhadamente, como as *DNA binding proteins*, endonucleases e exonucleases participam da transformação bacteriana.
2. O que você entende por “sexo” bacteriano?
3. O que é um fago deficiente e como o mesmo pode transferir genes bacterianos?
4. Como os túbulos de pilina transferem segmentos de DNA?
- 5 Explique o que é uma célula Hfr, uma célula F+ e uma célula F-, do ponto de vista da recombinação



QUESTÃO EXTRA:

“Explique o que você entende por recombinação recíproca e recombinação não-recíproca”