



Métodos da técnica do DNA recombinante feitos na *Escherichia coli*

Inaiá Palmiro Bento Francisco¹; Letícia Firmiano de Jesus²; Diones Antônio Borges³

Revisão: As bactérias sempre foram vistas ou comparadas apenas ao acometimento de patologias no ser humano. A partir do aprimoramento de metodologias provenientes dos avanços da Engenharia Genética, foi possível desenvolver a tecnologia do DNA-recombinante. Sendo possível sintetizar enzimas industriais, hormônios de crescimento, vacinas, medicamentos entre outros produtos que contribuíram para o avanço da biotecnologia e da indústria farmacêutica. O presente trabalho pretende analisar e apresentar as aplicações e finalidades de utilização da *Escherichia coli* em processos biotecnológicos, descrevendo seu método de extração hormonal, a partir da técnica laboratorial.

Palavras-chave: Engenharia genética. DNA-recombinante. Biotecnologia. *Escherichia coli*. Técnica laboratorial.

Recombinant DNA technique methods made in the *Escherichia coli*

Abstract: Bacteria have always been seen or compared only to an accompaniment of human pathologies. From the improvement of methodologies obtained from advances in genetic engineering, it was possible to develop a recombinant DNA technology. Being able to synthesize industrial enzymes, growth hormones, vaccines, medicines and other products that contribute to the advancement of biotechnology and the pharmaceutical industry. This paper aims to analyze and present the applications and purposes of using *Escherichia coli* in biotechnological processes, describing its method of hormonal extraction, using the laboratory technique.

Keywords: Genetic Engineering. Recombinant DNA. Biotechnology. *Escherichia coli*. Laboratory technique.

Introdução

O presente estudo relata a trajetória da ocorrência das infecções pela *Escherichia Coli* ao longo da história humana e a contribuição da mesma à saúde humana com o desenvolvimento de ferramentas pela Engenharia Genética. Citando a aplicação na biotecnologia e descrevendo o método de extração hormonal, a partir da técnica do DNA- recombinante (TDR). Com o intuito de promover a divulgação da TDR e suas aplicações, principalmente pela utilização da *E. coli*. O trabalho foca na promoção e divulgação no ambiente acadêmico, que ainda hoje dispõe de pouco material sobre TDR em língua portuguesa.

¹ Graduanda em Biomedicina- UEMG / PASSOS. inaiá_palmiro@hotmail.com;

² Graduanda em Biomedicina- UEMG / PASSOS. leticia.firmiano@outlook.com;

³ Docente de Biomedicina- UEMG / PASSOS. dionesborges@usp.br.

A partir de uma revisão sistemática de literatura, foram selecionados 2 livros como base, além de artigos, teses e revistas, referente ao período de 2001 a 2019, na biblioteca virtual SciELO e Google Acadêmico. Foram combinados com as associações e desfechos de interesse: técnica do DNA recombinante; engenharia genética; terapia gênica; *Escherichia coli*. Outros critérios de escolha são aqueles que estavam disponíveis na íntegra em língua portuguesa e que estivessem relacionados com a bactéria *Escherichia coli* e Biotecnologia.

As bactérias são seres unicelulares e procariontes, do reino Monera, associadas na maioria das vezes a ocorrência e proliferação de diversas patologias e processos de decomposição de matéria orgânica (UJVARI, 2012). Entretanto, pode conviver em simbiose com o organismo do ser humano, podendo ter grande utilidade biológica. São utilizadas para biorremediação, onde degrada poluentes; fermentação láctica, auxiliando no processo digestivo; ou probióticos, culturas de microrganismos vivos que são aplicadas ou ingeridas com objetivo de prevenir ou tratar patologias (MOREIRA, 2015).

Em processos laboratoriais também é possível isolar uma cepa do microorganismo e clonar um gene de interesse, sintetizando a proteína desejada em larga escala, pela TDR. Desde os anos 50 e 60 iniciaram os estudos da TDR, no qual, mais tarde realizaram experimentos de recombinações de diferentes espécies *in vitro* (RESENDE, 2015).

A primeira bactéria utilizada com sucesso foi a *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa, considerada a mais simples célula hospedeira, não contendo modificações pós-traducionais como ocorre nos eucariotos. Tem como características sua facilidade de manuseio, baixo custo de cultivo e a abundância reprodução de proteína que produz (CHAVES, 2009).

Com o aprimoramento da TDR, foi possível o isolamento dos mais diversos genes específicos, possibilitando a produção de biofármacos, terapias gênicas e animais transgênicos. Tornando possível o avanço de pesquisas nas diversas áreas da biotecnologia industrial e engenharia genética (RESENDE, 2015).

Fundamentação Teórica

As bactérias que vivem no lúmen intestinal e demais áreas corpóreas de animais e seres humanos, eram conhecidas por sua patogenicidade como o desenvolvimento de quadros de infecções do trato urinário, bacteremia, meningite e doenças diarreicas e demais síndromes clínicas mais comuns. Contudo a espécie bacteriana só apresenta atividade patogênica, quando

as defesas naturais são comprometidas e/ou não há resposta imune conhecida ao determinado agente (STELLA, 2009).

Em 1971, um grupo da Universidade de Stanford, desenvolveu um híbrido de DNA de um bacteriófago lambda e do vírus SV-40, constituindo a primeira molécula de DNA Recombinante. Contudo, só em 1973, Herbert Boyer e Stanley Cohen realizaram o experimento de introduzir o DNA ribossomal de um sapo em um plasmídeo, que foi introduzida na *E.coli*, observando-se a capacidade de replicação da bactéria (RESENDE, 2015).

A partir da TDR foi sintetizado o primeiro fármaco, a insulina humana, proveniente de cepas de *E. coli*. Iniciou-se então uma nova era na obtenção de proteínas em larga escala, podendo ser utilizados outros organismos de origem além da bactéria, como fungos e leveduras. Após o sucesso da comercialização do fármaco, foi possível o manuseio de outros produtos terapêuticos derivados da engenharia genética, como pode ser observado na Tabela 1 (RESENDE, 2015).

Tabela 1: Produtos terapêuticos produzidos através da engenharia genética.

PRODUTO	APLICAÇÃO	HOSPEDEIRO
Insulina Humana	Tratamento de diabetes	Bactérias / Leveduras
Hormônio de crescimento	Desordem de crescimento	Bactérias / Leveduras
Fator de crescimento epidérmico	Cicatrização de feridas	Leveduras
Interleucina 2	Tratamento de câncer	Bactérias / Leveduras
α -interferon	Antiviral, agente antitumoral	Bactérias
β -interferon	Tratamento de esclerose múltipla	Bactérias / Células de mamíferos
Eritropoetina	Tratamento de certos tipos de anemia	Células de mamíferos
Fator VII, VIII e IX	Agentes coagulantes	Células de mamíferos
Ativador de plasmogênio tecidual	Dissolve coágulos	Bactérias / Leveduras / Células de mamíferos
Anticorpos monoclonais (MABs)	Diversas doenças. Ex: rituximabe e humira	Células de mamíferos

Fonte: RESENDE, 2015.

Técnica do DNA Recombinante (TDR)

Com o intuito de manufaturar a insulina artificial, utiliza-se a clonagem da *E. coli* mutada com o segmento gênico, que representa a produção da proteína e acrescentado a este,

um fator de resistência a um antibiótico específico. A bactéria multiplicará em um meio de cultura contendo o antibiótico específico. Isso só é possível, pois ao incorporar os genes, a característica adquirida pelas bactérias torna-se permanente e hereditária (ROSSI, 2001).

Através do processo de reprodução assexuada, serão geradas novas células com as modificações gênicas previamente alteradas. Resultando em células portadoras de vetores com a sequência codificadora da proteína desejada e o marcador de resistência (ZAHA, 2014).

Para a produção do vetor de expressão genica utiliza-se enzimas de restrição, que rompem a dupla fita do DNA circular bacteriano, inserindo o gene e a DNA-ligase, catalizadora das ligações fosfodiéster. A transformação bacteriana ocorre com a introdução desse vetor no material gênico expresso nas cepas de interesse. Posteriormente o detalhamento das demais etapas envoltas na TDR (ROSSI, 2001).

Enzimas de Restrição

Werner Arber no final da década de 60 ao estudar mecanismos da resistência de bactérias a uma infecção viral, reconheceu o papel da primeira enzima de restrição, que passou a ser conhecida como tesoura molecular. Atualmente a ciência tem o conhecimento sobre a existência de número superior a 3000 enzimas de restrição, com diferentes especificidades e muitas delas já são utilizadas diariamente em laboratórios. Os estudos de Arber evidenciaram que a *E. coli* possui uma enzima de restrição capaz de recortar regiões específicas do DNA de um vírus, então a denominou como ***EcoRI*** (*Escherichia coli Restriction I*) (CIB, 2016).

Desde a descoberta de Arber, no início da década de 70, isolar e manipular genes de interesse se tornou uma realidade através da TDR, por exemplo evitando os inúmeros cruzamentos-testes, feitos como nos estudos de longo tempo desenvolvidos por Mendel (CIB, 2016).

As enzimas responsáveis por cortar as moléculas dos ácidos nucleicos são chamadas de nucleases, enquanto as que estão no interior dessas moléculas são as endonucleases. Essas identificam sequências específicas de 4 ou 6 bases, ligam-se à fita do material gênico e realizam uma quebra no mesmo ponto. Essas regiões são denominadas sítios de restrição. (RESENDE, 2015).

Existem três tipos de endonucleases, porém somente as Tipo 2 são empregadas a fim de reconhecer sequências nucleotídicas palindrômicas. Essas são caracterizadas por serem lidas tanto no sentido de 5' para 3', quanto de 3' para 5' e têm a mesma sequência de bases. Após o

reconhecimento, a fita é cortada de modo que as extremidades possam ser coesivas, onde é possível ter uma extremidade 5' ou 3' protuberante; ou abrupta, onde a ruptura não terá protuberância, dificultando o pareamento por complementariedade das fitas (RESENDE, 2015).

Há também enzimas de cortes raros que reconhecem 8 ou até mais bases, como a PAC-1, que são utilizadas para estratégias de clonagem molecular. Isso é explicado pois, quanto maior a sequência específica, reconhecida pela enzima, menor a probabilidade de encontrar um sítio de restrição repetido (RESENDE, 2015).

DNA Ligase

A DNA-ligase é uma enzima que une o grupo fosfato da extremidade 5' e a hidroxila da extremidade 3' do DNA, caracterizando a ligação fosfodiéster. Para que isso ocorra, é necessário ATP, fornecedor de energia, e magnésio, cofator enzimático que auxilia a inserção do nucleotídeo correto. Um facilitador da catalise da ligação é a ruptura coesiva que, aproxima naturalmente as extremidades por complementariedade (RESENDE, 2015).

Vetores de Expressão

Os vetores são adicionados além da origem de replicação, uma região promotora, uma região codificadora para a ligação do ribossomo, um códon iniciador, a sequência gênica produtora de insulina humana, uma sequência gênica resistente a um antibiótico específico e uma sequência terminadora de transcrição. Para adquirir aquela produtora de insulina, é preciso um pedido de compra para empresa de sua escolha com a sequência copiada em um banco de dados (NASCIMENTO, 2007).

Com isso passam a ser chamados de vetores de expressão e são utilizados para a expressão gênica do fragmento genômico, tendo por objetivo transcrever altos níveis de RNA mensageiro para que se traduzam maiores quantidades de proteínas (RESENDE, 2015).

Para a inoculação podem ser utilizados plasmídeos, bacteriófagos ou cosmídios, todos intitulados vetores, que se introduzem com maior facilidade nas células. Os plasmídeos são fitas de DNA circulares independentes. Os cosmídios são vetores híbridos, sendo moléculas de DNA circular extracromossomais, tal como os plasmídeos (ZAHA, 2014).

Os bacteriófagos são vírus que, em meio natural introduzem seu DNA- viral em células, a fim de multiplicar seu material genético dentro dela, até gerar a lise celular. No laboratório é utilizado apenas para a introdução dos genes de interesse (LOPES, 2012).

Transformação Química

De modo geral, a transformação bacteriana é a incorporação de DNA exógeno, tornando-se permanente e hereditário dentro do cultivo. Para que isso ocorrer é necessário que as bactérias sejam competentes, ou seja, estejam em condições fisiológicas adequadas. Esse estado pode ser alcançado de forma natural ou induzido. Na primeira forma, a bactéria tem a capacidade natural de receber o inserto, fato determinado pela presença de proteínas ligadas à superfície do DNA, que desempenham função de receptoras (NASCIMENTO, 2007).

Na segunda, Mandel e Higa detectaram, nos anos 70 que a *E.coli* poderia ser transformada de maneira induzida, utilizando a suspensão em cloreto de cálcio gelado, responsável por deixar a parede celular mais permeável e, posteriormente, aplicando um curto choque térmico. Nesse processo abrem-se poros na membrana, assim induz o microorganismo a ser competente, ou seja, a adquirir o DNA exógeno (NASCIMENTO, 2007).

Seleção de Antibiótico

É necessário selecionar as bactérias através de um marcador de antibiótico presente nos vetores. Ao introduzi-las no meio antibiótico, crescerão e se replicarão, pois contêm o vetor que confere sua resistência. Após essa identificação, é dado um sinal químico que as instrui a traduzir a proteína alvo, atuando como “mini fábricas”, produzindo em grande quantidade em larga escala (KASVI, 2017).

Purificação

A purificação consiste em isolar e estabilizar a proteína alvo, com finalidade de remover impurezas, como os ácidos nucleicos livres e demais proteínas, com base em suas características. O processo se inicia com a lise da *E.coli* deixando livres todas as proteínas presentes no interior da membrana, toda substância proteica é recolhida e submetida à cromatografia de afinidade para que ao fim deste processo obtenha-se o hormônio proteico insulínico puro (MARTINS, 2009).

A cromatografia representa uma vasta quantidade de técnicas de separação de misturas e baseia-se na diferença das propriedades físicas, entre as moléculas distintas dentro de uma solução. O método convencional utilizado é o de Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC), tornando possível o processo de purificação da insulina humana (MARTINS, 2009).

O processo cromatográfico compreende cinco etapas: o equilíbrio das fases; aplicação da amostra; lavagem ou remoção do material não ligado; fracionamento da biomolécula e limpeza da coluna, onde ocorre a eluição e lavagem de impurezas (MARTINS, 2009).

Conclusões

A clonagem gênica tem como finalidade: o sequenciamento e separação de fragmentos de DNA; estudo da transcrição e tradução de genes e sua expressão funcional; sintetização de proteínas para produção de anticorpos e uso terapêutico; criar bibliotecas de DNA; produção de vacinas recombinantes, enzimas, hormônios. Fato esse alcançado graças à tecnologia do DNA-recombinante, descoberta através da Engenharia Genética, executada de forma simples, porém ainda com alto custo financeiro.

São diversas vantagens que essa tecnologia trouxe ao desmistificar que bactérias em geral só tinha finalidade de trazer prejuízos ao meio. Sua aplicação comercial e biotecnológica parecem ter um potencial inesgotável. A insulina, por exemplo, foi à primeira proteína humana produzida comercialmente através de cepas bacterianas não patogênicas.

Por meio dessas técnicas de manipulação, também foi possível: criar plantas que produzem seus próprios inseticidas, sendo inofensivos ao humano; aumento da produção de leite através da somatotrofina bovina recombinante, amplamente usada nos Estados Unidos; tratar a fibrose cística pela terapia gênica que fornece uma cópia normal do gene à paciente que não possuam esse gene funcional; produção de anticoagulantes por meio de ativadores de plasminogênio tecidual que acionam a plasmina, enzima diluidora de trombos, frequentemente usado em tratamentos de derrames, prevenção de coágulos sanguíneos e ataques cardíacos.

Referências

CHAVES, R. V. A. Avaliação de dois clones de *Escherichia coli* recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de *Leishmania chagasi* (kmp11 e P36). Dissertação

(Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia). A tecnologia do DNA recombinante. 2016. Disponível em: <https://cib.org.br/dna-recombinante/>. Acesso em: 12 de junho de 2019.

KASVI. Os princípios da clonagem molecular: DNA recombinante. 2017. Disponível em: <<https://kasvi.com.br/clonagem-molecular-dna-recombinante/>>. Acesso em: 5 de out. 2019.

LOPES, D. S. A. et al. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. 2012. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, 10(1). pp.234-245.

MARTINS, A. R. N. Purificação de RNA por Cromatografia de afinidade com histidina imobilizada. Covilhã, Portugal. 2009. pp.28-33.

MOREIRA, C. Reino Monera. Rev. Ciência Elem., Vol. 3. (4): 255. 2015.

NASCIMENTO, A. A. C. et al. Tecnologia do DNA Recombinante. Universidade de São Paulo. 2007. 87 p.

ROSSI, Marcelo. Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1. São Paulo, 2001.

RESENDE, R. R. Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações. Vol 2.1.ed. Editora Blucher, 2015. pp.16-64.

STELLA, A. E. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. São Paulo, 2009.

UJVARI, S. C. A história da humanidade contada pelos vírus, bactérias, parasitas e outros microrganismos. São Paulo: Editora Contexto, 2012. pp 16-22.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Biologia molecular básica. 5.ed. 2014. pp.338-339.



Como citar este artigo (Formato ABNT):

FRANCISCO, Inaiá Palmiro Bento; JESUS, Letícia Firmiano de; BORGES, Diones Antônio. Métodos da técnica do DNA recombinante feitos na *Escherichia coli*. **Id on Line Rev.Mult.Psic.**, Julho/2020, vol.14, n.51, p. 467-474. ISSN: 1981-1179.

Recebido: 08/06/2020;

Aceito: 09/07/2020.