**Tema: Produção de compostos de interesse em bactérias usando DNA recombinante**

**Assunto escolhido: síntese de insulina**

**Alunos: João Pedro B Butenas(10758258) e Raul Veloso Devesa(10758752)**

 **Introdução:**

Grande parte dos compostos utilizados pelo ser humano na atualidade pelas suas propriedades farmacológicas, tanto para se tratar doenças quanto para o bem estar, são derivados da natureza pelo metabolismo dos diversos tipos de organismos existentes no mundo. Esses compostos podem ser obtidos tanto pela extração e purificação direta das partes do organismo que as contem, normalmente resultando em um baixo rendimento, já que os compostos de interesse representam uma pequena porcentagem do organismo no total, ou também por sínteses a partir desses compostos naturais, resultando em outros com ação farmacológica. Além disso, grande parte desses compostos e suas vias de biossíntese não podem ser reproduzidos in vitro nos laboratórios devido a complexidade e necessidade do aparelho enzimático e condições necessárias dentro de um organismo ou célula para que essas reações aconteçam. Dessa forma a biologia molecular pode ajudar na resolução de alguns problemas para obtenção desses composto e melhora na produção e obtenção deles, como é o caso da insulina gerada em bactérias através da tecnologia do DNA recombinante. A insulina é um importante hormônio responsável pela redução da glicemia e é usada para tratar paciente de diabetes , uma das doenças que afeta mais pessoas no mundo, que não produzem a insulina de forma endógena.

 **Descrição do Problema:**

Em 1921 a insulina foi descoberta por Frederick Banting, em parceria com Charles Best.Essa descoberta representou um enorme avanço para os paciente portadores de diabetes que até então não tinha tratamento e eram submetidos a dietas rigorosas para controlar a doença e mesmo assim ter uma baixa expectativa de vida.Com essa descoberta a insulina passou a ser extraída e purificada através do pâncreas de animais abatidos para o consumo humano, já que essa parte não é consumida e apresenta o hormônio em maior concentração. Apesar desse avanço, o método de obtenção da insulina não tinha um rendimento muito bom, sendo [necessárias oito toneladas de pâncreas animais para produzir aproximadamente 230 ml de insulina purificada](http://www.diabetesforecast.org/2013/jul/making-insulin.html?referrer=http://americanhistory.si.edu/blog/2013/11/two-tons-of-pig-parts-making-insulin-in-the-1920s.html). Além disso, outro problema apresentado por essa via de obtenção da insulina era que apesar da insulina bovina e suína ser bastante semelhante à humana, as suas pequenas diferenças podiam resultar em reações imunológicas em alguns pacientes que acabavam produzindo anticorpos contra o hormônio, neutralizando sua ação e resultando em respostas inflamatórias nos sítios de injeção. Devido a esses problemas a indústria continuou pesquisando métodos de aprimorar o rendimento dessa produção e ao mesmo tempo diminuir os problemas e efeitos colaterais causados pela insulina de origem animal e assim chegamos à metodologia atualmente usada de obtenção de insulina para tratamento de diabetes através da tecnologia do DNA recombinante principalmente em células de *Escherichia coli.* Essa tecnologia consiste na introdução do gene de produção de insulina de células pancreáticas humanas em plasmídeos vetoriais que introduzirão esse DNA nas células das bactérias, que agora poderão produzir a insulina humana.

 **Ferramentas e conteúdos de Biologia Molecular necessários para a resolução do problema**

 DNAs recombinantes são moléculas de DNA artificial que possuem segmentos covalentemente ligados, que são derivados de duas ou mais fontes, a tecnologia do rDNA envolve uma modificação direta do DNA, de maneira a modificar característica do organismo vivo ou introduzir novas características. O isolamento do material genético de interesse é administrado por meio de técnicas de clonagem molecular que incidem em inserir um organismo vivo a amplificar a sequencia de DNA de interesse em sistemas que sejam permissivos uma fácil purificação e recuperação do referido fragmento de DNA, para tal são utilizadosos chamados vetores de clonagem, dos quais a sequencia de DNA de interesse é inserida fazendo uso da enzima DNA ligase. Após isolamento, os gene de interesse serão incorporados no genoma de um organismo alvo, dessa maneira, resultando em um organismo geneticamente modificado podendo passar tal informação genética adquirida hereditariamente.
 A clonagem de um DNA envolve o afastamento de um gene especifico e sua ligação a uma molécula de DNA transportadora e após a replicação desse DNA modificado o resultado é um aumento da seletividade de um gene em particular, a bactéria *Esherichia coli* foi um os primeiros organismo utilizados para a tarefa do DNA recombinante e continua sendo a célula hospedeira mais comumente utilizada. Dentre as etapas de clonagem de um segmento de DNA temos: cortar o DNA no local preciso, juntas dois fragmentos de DNA covalentes, escolher uma pequena molécula de DNA capaz de se auto replicar, um método para transferir o DNAr para uma célula hospedeira e por fim selecionar as mesmas que contenham o DNAr. As enzimas utilizadas para fragmentar o DNA tornando extremidades de fitas simples de DNA que aceitam a ligação dos fragmentos são de grande importância para a tecnologia do rDNA, visto que dessa maneira, o DNA bacteriano poderá se recombinar com o DNA humano ou de qualquer outra espécie, abrindo a possibilidade de clonar genes humanos e isolar possíveis proteínas de culturas bacterianas.
 Vale dizer que mesmo pequenas distinções entre moléculas de DNA relacionadas são rapidamente detectadas, pois seus fragmentos de restrição poderão ser separados e visualizados através de uma eletroforese em gel. As enzimas de restrição mais usadas para realizar-se a clonagem de um segmento de DNA são aquelas que geram fragmentos com extremidades de fita simples complementares de até quatro nucleotídeos de comprimento, chamadas extremidades coesivas. Fragmentos de DNA que possuem extremidades coesivas complementares poderão ser acoplados pela DNA ligase que catalisará a formação de uma ligação fofdiéster entre duas moléculas. A DNA ligase necessita de um grupo funcional OH livre na extremidade 3’ de uma das cadeias de DNA e também um grupamento fosfato na extremidade 5’ de outra cadeia.
 Depois do isolamento de uma informação genética, um fragmento de DNA obtido pela clivagem com enzimas de restrição, poderá ser empregado em outra molécula de DNA diferente sendo capaz de amplificar tal informação genética em várias cópias, tal processo de amplificação é realizado por meio do uso de moléculas de DNA que recebem o nome de vetores de clonagem molecular. E são justamente esses vetores de clonagem que transportam o inserto de DNA para a célula hospedeira, onde ocorrerá sua replicação, a molécula de rDNA é introduzida dentro de uma célula hospedeira apropriada, este processo de introdução de DNA em células é chamado de transformação.
 A célula hospedeira que possui uma única molécula de rDNA, se multiplica várias e várias vezes, formando uma colônia de células provenientes da célula original, essas células recebem o nome de células transformadas e são facilmente diferenciadas das células que não receberam a molécula de DNA recombinantes devido a presença de um gene marcador. Todos os vetores de clonagem necessitam possuir sequências que permitam sua auto replicação dentro da célula hospedeira, os vetores mais úteis possuem ainda, pelo menos um sítio único de clonagem que é justamente um sitio de restrição que não se repete na molécula, dessa maneira, permitindo a inserção sítio específica de uma outra molécula de DNA. Os três vetores de clonagem que são mais utilizados em *Esherichia coli* são: plasmídios, bacteriófagos e cosmídios. Os plasmídios são moléculas de DNA circulares que se replicam isoladamente do cromossomo hospedeiro e podem ser inseridos nas células bacterianas por processo de transformação.

**Referências**
https://profissaobiotec.com.br/insulina-recombinante-como-afetou-vida-dos-pacientes/

<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/248>

<https://www.fiojovem.fiocruz.br/insulina-avancos-da-pesquisa>

http://www.prac.ufpb.br/anais/xenex\_xienid/xi\_enid/monitoriapet/RESUMOS/Area6/6CCENDBMMT04-P.pdf