MILENE CRISTINA SILVA MARTINS BEZERRA

O USO DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE INSULINA HUMANA

Rondonópolis
2021

MILENE CRISTINA SILVA MARTINS BEZERRA

O USO DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE INSULINA HUMANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Instituição UNIC Rondonópolis - Floriano Peixoto, como requisito parcial para a obtenção do título de graduado em Bacharelado em Farmácia.

Orientadora: JESSICA RUFINO

Rondonópolis
2021

MILENE CRISTINA SILVA MARTINS BEZERRA

O USO DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE INSULINA HUMANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Instituição UNIC Rondonópolis - Floriano Peixoto, como requisito parcial para a obtenção do título de graduado em Bacharelado em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Titulação Nome do Professor(a)

Prof(a). Titulação Nome do Professor(a)

Prof(a). Titulação Nome do Professor(a)

Rondonópolis , 28 de abril de 2021

Dedico este trabalho aos familiares e professores por muito contribuir para minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A tutora Jessica Rufino que contribuiu de maneira relevante à elaboração do trabalho.

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”. John Dewey

BEZERRA, Milene Cristina Silva Martins. **O uso da biotecnologia na produção de insulina humana.** 2021. 31. Trabalho de Conclusão de Curso em graduação de Farmácia – UNIC Ary Coelho, Rondonópolis, 2021.

RESUMO

A Biotecnologia proporcionou avanços na área médica e na indústria farmacêutica principalmente com a criação da Tecnologia do DNA recombinante (DNA formado pela união de genes de organismos diferentes, resultando da combinação de diferentes sequências de DNAs). Essa tecnologia é empregada na produção de insulina artificial obtida através da bactéria Escherichia coli que ao ser modificada geneticamente passa a sintetizar o hormônio. A insulina é o principal meio utilizado no tratamento do Diabetes Mellitus (DM), uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não utiliza eficazmente a insulina produzida. Entender como esse feito foi possível e as técnicas utilizadas para modificar e até mesmo criar novos organismos geneticamente modificados para produção de insulina humana é muito importante visto que com essa tecnologia a insulina artificial é produzida em menor tempo e em maior escala, beneficiando os portadores do DM, para que dessa forma possam levar uma vida normal tornando a pesquisa contínua de valor inestimável.

Palavras-chave: Engenharia genética. Clonagem molecular. Tecnologia do DNA recombinante. Insulina artificial. Diabetes mellitus.

BEZERRA, Milene Cristina Silva Martins. **The use of biotechnology in the production of human insulin**. 2021.31. Pharmacy Course Completion Work– UNIC Ary Coelho, Rondonópolis, 2021.

ABSTRACT

Biotechnology has provided advances in the medical field and in the pharmaceutical industry mainly with the creation of recombinant DNA technology (DNA formed by the union of genes from different organisms, resulting from the combination of different DNA sequences). This technology is used in the production of artificial insulin obtained through the bacterium Escherichia coli which, when modified genetically, starts to synthesize the hormone. Insulin is the main means used in the treatment of Diabetes Mellitus (DM), a chronic disease that occurs when the pancreas does not produce enough insulin or when the body does not use the insulin produced effectively. Understanding how this feat was possible and the techniques used to modify and even create new genetically modified organisms for the production of human insulin is very important since with this technology artificial insulin is produced in a shorter time and on a larger scale, benefiting patients with DM, so that in this way they can lead a normal life making continuous research invaluable.

Keywords**:** Genetic engineering. Molecular cloning. Recombinant DNA technology. Artificial insulin. Diabetes mellitus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Produção de insulina recombinante humana 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
PA	Potencial de ação
rDNA	DNA recombinante
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. DIABETES MELLITUS E A EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE INSULINA COMERCIALIZÁVEL. 14
3. CONCEITOS BÁSICOS SOBRE BIOTECNOLOGIA, BIOFÁRMACOS E DNA RECOMBINANTE. 19
4. AS ETAPAS DE PROCESSAMENTO ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE INSULINA ARTIFICIAL ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE PARA O TRATAMENTO DE DIABETES MELLITUS. 22
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 28
REFERÊNCIAS 29

1. INTRODUÇÃO

Ao passar dos anos o homem conseguiu codificar o DNA que é a molécula mais importante da vida. A partir daí foi possível desenvolver técnicas que modificassem e até mesmo criassem novos organismos conhecidos como organismos geneticamente modificados. Isso proporcionou um grande salto para a medicina no tratamento e cura de doenças, inclusive da Diabetes Mellitus (DM), uma doença que vem aumentando de uma maneira preocupante, promovendo um grande alarde na saúde pública.

A insulina é um dos principais medicamento utilizado no tratamento do DM, uma doença crônica no qual o pâncreas não produz insulina suficiente ou o corpo não utiliza eficazmente a insulina produzida. Grande parte das pessoas que possuem DM necessita do uso de insulina constantemente e atualmente graças aos avanços da biotecnologia e da padronização e validação dos métodos que compõem a Tecnologia do DNA recombinante, pode-se produzir a mesma artificialmente.

Entender como esse feito foi possível e as técnicas utilizadas para modificar e até mesmo criar novos organismos geneticamente modificados para produção de insulina humana é muito importante visto que a pesquisa contínua tem um valor inestimável e contribui para o desenvolvimento saberes que vão incorporando novidades e se aprimorando à medida que o conhecimento avança.

A Biotecnologia proporcionou avanços na área médica e na indústria farmacêutica principalmente com a criação da Tecnologia do DNA recombinante (DNA formado pela união de genes de organismos diferentes, resultando da combinação de diferentes sequências de DNAs). Mas, como essa tecnologia é empregada na produção de insulina artificial obtida através da bactéria *Escherichia coli* geneticamente modificada a tornando capaz de sintetizar o hormônio?

Nesse sentido, o objetivo geral dessa monografia foi pesquisar sobre a produção de insulina humana recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. Mas para responder a pergunta fez-se necessário estudar a diabetes mellitus e a evolução da produção de insulina comercializável. Foi importante também compreender conceitos básicos sobre biotecnologia, biofármacos e DNA recombinante. Assim, tornou-se possível entender as etapas de processamento envolvidas na produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus.

O tipo de pesquisa realizado nesse trabalho foi uma Revisão de Literatura, onde foram pesquisados livros, dissertações e artigos científicos selecionados através de busca nas seguintes bases de dados como livros, sites de banco de dados PUBMED, MEDLINE e SCIELO, artigos e dissertações. O período dos artigos pesquisados vieram de trabalhos publicados nos últimos 10 anos. As palavras-chave utilizadas na busca foram: Engenharia genética, clonagem molecular, tecnologia do DNA recombinante, insulina artificial e diabetes mellitus.

2. DIABETES MELLITUS E A EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE INSULINA COMERCIALIZÁVEL

O diabetes mellitus (DM) é uma doença tão antiga quanto a própria humanidade. O papiro de Ebers, da época 1500 a.C., menciona a diurese frequente e abundante, sede incontrolável e emagrecimento acentuado, como suas principais manifestações clínicas. Aretaeus, médico romano, criou o termo dia-betes que significa “passar através” pela excessiva diurese, parecido à drenagem de água por um sifão. No século VI, médicos hindus registraram com detalhes alguns sintomas da doença e relataram o sabor adocicado da urina destes indivíduos (ARDUINO, 1973).

Hoje se sabe que a diabetes é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente pela baixa produção de insulina pelo pâncreas ou pela utilização de maneira incorreta pelo corpo. No entanto a insulina exerce um papel importante no metabolismo dos lipídios e aminoácidos em diferentes órgãos, tecidos e células. Isto leva então as complicações do diabetes categorizadas como distúrbios microvasculares e macrovasculares, que resultam em retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica (SBD,2017).

Segundo Boschero (1996) a secreção de insulina é um processo muito organizado que é estimulado por substratos energéticos metabolizáveis pela célula β pancreática, sendo a glicose o mais importante. Essas célula β atua como um "sensor" de glicose, que libera a quantidade de insulina proporcional a quantidade de glicose que chega a ela. Por exemplo, ao ingerir uma rapadura, seguirá um aumento nos níveis da glicose sanguínea. As células β, captam essa glicose, usando um transportador, o GLUT1/2.Assim que a glicose entra na célula, ela será fosforilada por duas enzimas: a hexoquinase IV e a glicoquinase. Com a fosforilação, a glicose se transforma em Glicose 6-fosfato (G6P), a qual fica impossibilitada de sair da célula.

O metabolismo da glicose em piruvato pela glicólise gera uma quantidade de ATP.O piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, que é convertido em acetil-CoA. Na sequência, o acetil-CoA entra no ciclo de Krebs aumentando o NADH e FADH2. Através desse metabolismo adicional da glicose gera mais ATP e a fração ATP/ADP aumenta no citoplasma.Com a relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP, e a despolarização da membrana celular. A despolarização atinge o limiar e deflagra um potencial de ação

(PA) na célula β. Dessa maneira o PA promove a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes, e o influxo do cálcio através desses canais. O aumento do cálcio intracelular estimula a secreção da insulina pelas ilhotas pancreáticas (BOSCHERO, 1996).

A patogênia do diabetes mellitus, no caso, o tipo I é a lesão ou destruição das células beta das ilhotas pancreáticas. Sendo assim, a produção e secreção de insulina se torna insuficiente para controlar os níveis de glicose no sangue, causando hiperglicemia. São vários fatores que fazem as células beta serem agredidas e mortas como os fatores endógenos que são os polimorfismos genéticos, sobretudo dos genes do HLAII (relacionados a apresentação de antígenos), e as disfunções imunológicas, tanto relacionando a imunidade inata quanto a adquirida com seu componente celular (linfócitos T auto-reativos) e humoral (a auto-anticorpos), que em resumo é uma resposta auto-imune, direcionada para lesar e destruir as células beta das ilhotas (Silva et al., 2008) .

Os fatores Ambientais ou exógenos também podem levar também a lesão e morte das células beta. Infecções virais (exemplo enterovírus) que apresentam antígenos virais com mimetismo homólogo a antígenos das células beta ou mesmo terem algum tropismo pelas células beta, levando a um ataque imune direcionado a elas. A nutrição, hiperglicemia, pode afetar as células beta, pela glicotoxicidade e a hipertrigliceridemia (Ácidos graxos altos) que podem levar a uma resposta inflamatória nelas. Toxinas, drogas e poluentes se apresentam também como fatores de risco (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994).

Estima-se que existam cerca de 1 milhão de diabéticos no Brasil que dependem de insulina e a previsão é de que, em 2030, haja uma população de 11,3 milhões de brasileiros com um dos tipos do diabetes. De acordo com estatística divulgada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes (2017), um novo caso de diabetes surge a cada cinco segundos no mundo. Cerca de 250 milhões de pessoas em todos os países tem diabetes e a projeção feita pela Organização Mundial de Saúde (2008) para o ano de 2030 é que esse número dobre. No Brasil, segundo a SBD, pelo menos 10 milhões de pessoas têm a doença – o equivalente a 5,9% da população brasileira. O diabetes mellitus gera grande impacto econômico nos serviços de saúde, como consequência dos crescentes custos do tratamento da doença e, sobretudo das complicações, como a doença

cardiovascular, a diálise por insuficiência renal crônica e as cirurgias para amputações de membros inferiores.

Para chegar ao momento em que puderam tratar a diabetes com um preparado de insulina, os pesquisadores precisaram se basear em várias décadas de conhecimento acumulado por vários cientistas. Sendo a diabetes uma doença evolutiva, quase todos os pacientes requerem tratamento farmacológico, pois as células beta do pâncreas atingem um estado de falência com o passar do tempo. Muitos desses tratamentos são feitos com insulina, tendo este a função de reduzir a taxa de glicose no sangue, ou seja, é responsável por levar o açúcar contido nos alimentos até as células, que o utilizam para gerar energia. Para suprir a falta desse hormônio no organismo daqueles que possuem a doença, algumas técnicas foram criadas (LIMA, 2001).

No ano de 1869, Langerhans identificou conjuntos de células no tecido pancreático que chamou de ilhotas celulares. Na França em 1889, Joseph von Mering e Oskar Minkowski na Universidade de Strasbourg, observaram que a retirada do pâncreas de cães durante pesquisas sobre a digestão de gorduras provocava sinais e sintomas parecidos aos do diabetes. O cientista alemão Georg Zuelzer em 1908 desenvolveu o primeiro extrato pancreático injetável que diminuiu a glicosúria, no entanto esta modalidade terapêutica não evoluiu em virtude de importantes efeitos adversos (PIRES; CHACRA, 2008).

Segundo Pries e Chacra (2008) a insulina foi descoberta em 1921 por Frederick Banting e Charles Best, no laboratório do professor de fisiologia John J. R. MacLeod, durante experimentos que tinham como objetivo o isolamento da secreção interna pancreática. Após experimentos em cães, Banting e Best sentiram-se encorajados e iniciaram os experimentos em humanos. Em 11 de janeiro de 1922, Leonard Thompson de 14 anos em estado crítico, foi o primeiro paciente a receber de modo injetável extrato pancreático.Nesta primeira aplicação não houve efeito na redução da glicose e de corpos cetônicos na urina e causou efeitos colaterais. Diante disso, o biólogo James Colip uniu-se ao grupo de Banting foi purificando o extrato pancreático, tentando diminuir os efeitos colaterais. Em seguida, foi aplicado novamente no mesmo paciente tendo respostas positivas e eficazes no tratamento. O tratamento era tão eficaz que foi reconhecido com o Prêmio Nobel em 1923, quando extratos de pâncreas (agora, principalmente, de porco e boi) já estavam disponíveis comercialmente, e

médicos da Universidade de Toronto treinavam outros profissionais no tratamento da doença.

Nos anos posteriores, a dieta de jejum prolongado que até então era o único tratamento, foi substituída pelas injeções de insulina que melhoravam significativamente os sintomas do diabetes. Foi visto como um milagre o que aquele líquido fazia. No entanto a insulina ainda era tirada de animais como bois e porcos. Contudo, tinha alguns reveses visto que não era totalmente compatível com o hormônio humano o que podia causar reações alérgicas e erupções na pele que resultavam em perda de tecido nos locais da injeção (PIRES; CHACRA, 2008).

Na década de 50 aconteceu mais uma descoberta envolvendo a insulina que rendeu um Nobel. Em 1958, Frederik Sanger, biólogo britânico, determinou a sequência exata de aminoácidos da molécula de insulina, a estrutura primária, sendo laureado com o Prêmio Nobel de Química. Já na outra década, Dorothy Crowfoot Hodgkin em 1964, utilizando a técnica de cristalografia de raios X permitiu a elucidação da estrutura tridimensional da insulina ganhando um Nobel por suas pesquisas (PIRES; CHACRA, 2008). Sabendo assim, a estrutura exata de aminoácidos da insulina foi possível a síntese de uma insulina “humana” e fez com que as insulinas animais fossem sendo retiradas do mercado.

Com o advento da biologia molecular, via DNA recombinante, iniciou-se a era das insulinas biosintética humanas, utilizadas por muitos pacientes até os dias atuais. Por meio da tecnologia do DNA recombinante é possível obter organismos com características novas ou não encontradas na natureza, que passou a permitir uma moderna alternativa para o melhoramento genético de espécies de valores biotecnológicos, o que contribuiu para a produção de polipeptídios de interesse, que nesse caso é a insulina. Ela foi o primeiro fármaco produzido com engenharia sintética ou biologia sintética (ou seja, pela inserção de genes pré-determinados em bactérias, células animais ou vegetais, técnica usada para sintetizar a substância desejada). Essa técnica foi desenvolvida na década de 1970 e vem sendo aperfeiçoada desde então (LIMA, 2001).

Hoje, a procura por insulinas que mimetizem o perfil fisiológico da insulina humana endógena incentivou a inúmeros pesquisas com o intuito de tratar o paciente com diabetes o mais próximo possível do que o pâncreas de um indivíduo não diabético normalmente faria. Para atingir esse objetivo utiliza-se um conceito basal-bolus. As insulinas de ação prolongada (basal) servem para diminuir o débito hepático

de glicose, e as insulinas de ação ultrarrápida (bolus) visa diminuir as excursões glicêmicas pós-prandiais, por isso também chamadas de insulinas prandiais. Esse feito é realizado fazendo modificações na estrutura molecular da insulina. Pensando em doenças como do diabetes, a grande aposta da medicina moderna está nos medicamentos biológicos, que podem ser o futuro do tratamento de várias doenças. No entanto no caso do diabetes o uso da insulina recombinante humana já é uma realidade (TSCHIEDEL, 2013).

3. CONCEITOS BÁSICOS SOBRE BIOTECNOLOGIA, BIOFÁRMACOS E DNA RECOMBINANTE

Biotecnologia é a ciência que faz uso dos conhecimentos das áreas de Biologia Engenharia e Química. Pode ser denominada de Engenharia bioquímica ou Bioengenharia no qual estuda as aplicações tecnológicas em seres vivos ou parte deles com a finalidade de obter produtos de interesse (GASSEN; BONACELLI; SALLES FILHO et al., 2000). Está presente em diversas aplicações práticas como na área farmacêutica, médica, agricultura, ciência e tecnologia de alimentos.

Na indústria farmacêutica, os medicamentos biológicos ainda representarem uma pequena parcela, no entanto apresentam a maior taxa de crescimento, com destaque para as vacinas, os anticorpos e as proteínas terapêuticas (GASSEN; BONACELLI; SALLES; FILHO et al., 2000). Dentre os produtos farmacêuticos, tem se a produção laboratorial de insulina como os primeiros resultantes do conhecimento da modificação genética.

No ano de 1953, dando início a Biotecnologia moderna os pesquisadores James Watson e Francis Crick definiram a estrutura do DNA, definindo então as características funcionais dos organismos vivos (VIEIRA; GAZZINELLI, 2002). A partir do ano de 1973 com a descoberta da técnica do DNA recombinante, pelos pesquisadores Stanley Cohen e Herbert Boyer, permitiu a criação das células artificiais e deram início a primeira empresa de Biotecnologia do mundo (REIS et al., 2009). Com essa descoberta os cientistas deram um grande passo importante para a era da Engenharia Genética.

A tecnologia do DNA recombinante (rDNA) consiste no isolamento de genes de interesse, conduzidos por técnicas de clonagem molecular. Essa tecnologia permite que “pedaços de DNA” de uma espécie sejam inseridos no genoma de outra espécie (LEHNINGER, 2011) possibilitando assim a produção de proteínas que podem ser usadas no tratamento de doenças ou distúrbios metabólicos .Essas moléculas produzidas levam o nome de biofármacos que são produzidos ou extraídos de seres vivos pelos processos biotecnológicos, ou seja ,são medicamentos onde o princípio ativo é um agente biológico e são produtos obtidos por meio de micro-organismos, células inclusive animais e plantas modificadas geneticamente, capazes de sintetizar in vivo

De acordo com Nardi (2002) e Lehninger (2011) os métodos usados para realizar estas tarefas e outras relacionadas à Tecnologia do DNA recombinante acarreta em cinco procedimentos gerais. Inicia-se ao cortar o DNA no local preciso com as enzimas de restrição, ou endonucleases, capazes de cortar a molécula de DNA em diferentes fragmentos. Esses fragmentos apresentarem a capacidade de se ligarem novamente a outros fragmentos de DNA, que podem ser do próprio organismo, da mesma espécie ou de espécies e organismos diferentes, inicialmente, por pontes de hidrogênio e, posteriormente, pela ação da DNA ligase, pelo estabelecimento das ligações fosfodiéster. Seleciona-se uma pequena molécula de DNA capaz de auto-replicação (vetores de clonagem) e um método para transferir o DNA recombinante para uma célula hospedeira e selecionar as células hospedeiras que contenham o DNA recombinante.

Em resumo temos o princípio da técnica de recombinação de DNA se dá ao identificar os genes de interesse que são cortados por enzimas de restrição específicas, e inseridos em outros fragmentos de DNA cortados pela mesma enzima, chamados plasmídeos. Esses novos fragmentos obtidos já são moléculas de DNA recombinante, pois combinam, na mesma estrutura, DNAs provenientes de diferentes origens, que serão inseridos em outro organismo, geralmente bactérias e leveduras. Essa inserção tem como objetivo conseguir uma população por meio do processo de clonagem, em que uma célula, que agora contém o gene de interesse, irá se multiplicar, dando origem a uma população de clones que mantêm esse gene. Ao final do processo, espera-se que todas as células contenham uma cópia do plasmídeo portador do gene de interesse e que ele possa se expressar produzindo a proteína desejada (Ito, 2018).

O sucesso dessa tecnologia de acordo com Ito (2018), se dá pela capacidade dos microrganismos sintetizarem uma grande quantidade de moléculas com alta precisão, de forma segura e sustentável. Entre os microrganismos mais usados estão a bactéria Escherichia coli e a levedura Saccharomyces cerevisiae. Utilizando vetores de clonagem, a sequência é inserida pela enzima DNA ligase e com o gene de interesse isolado, os fragmentos de DNA são incorporados ao genoma do organismo, o modificando.

De acordo com pesquisas, a manipulação de organismos vivos, identificação e separação de substâncias produzidas por eles, tem demonstrado um grande potencial terapêutico levando a novos medicamentos, também chamados de biofármacos.

Dessa maneira, eles tem se apresentando como parcela crescente na produção de remédios e são boa opção para o tratamento de doenças crônicas e complexas. No Brasil a primeira regulamentação dos Biofármacos foi pela RDC 80/2002, substituída em 2005 pela RDC 315/2005 e atualmente em vigor a RDC 55/2010, onde a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) fiscaliza rigorosamente (PIRES et al., 2013), sendo responsável por aprovar e regulamentar a produção dos biofármacos baseadas nas regulamentações da agência regulatória América, o FDA (*Food and Drug Administration*) e da Europa, à EMEA (*European Medicines Agency*).

A cada ano, mais de um quinto dos medicamentos lançados, são derivados de biotecnologia e sua produção é bem mais complexa que das drogas sintéticas. Isso acontece devido à composição heterogênea dos componentes ativos dos organismos, que são capazes de interagir com as proteínas do corpo humano. Logo, ao trabalhar com organismos vivos, material genético e substâncias produzidas por eles, é preciso ter muitos cuidados. Dessa maneira mesmo com as dificuldades, não só tecnológicas, mas também legais, os investimentos em pesquisa tem aumentando e podemos esperar uma tendência da indústria farmacêutica aplicar no organismo humano substâncias produzidas por outros organismos vivos. Sendo assim, a biotecnologia no desenvolvimento de medicamentos apresenta inúmeras vantagens como a produção de medicamentos mais eficazes e específicos, tendo menos efeitos colaterais, menores riscos de contaminação por agentes infecciosos e produção em larga escala de substâncias existentes, tendo como exemplo a insulina para o tratamento de diabetes (REIS et al., 2009).

4. AS ETAPAS DE PROCESSAMENTO ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE INSULINA ARTIFICIAL ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE PARA O TRATAMENTO DE DIABETES MELLITUS

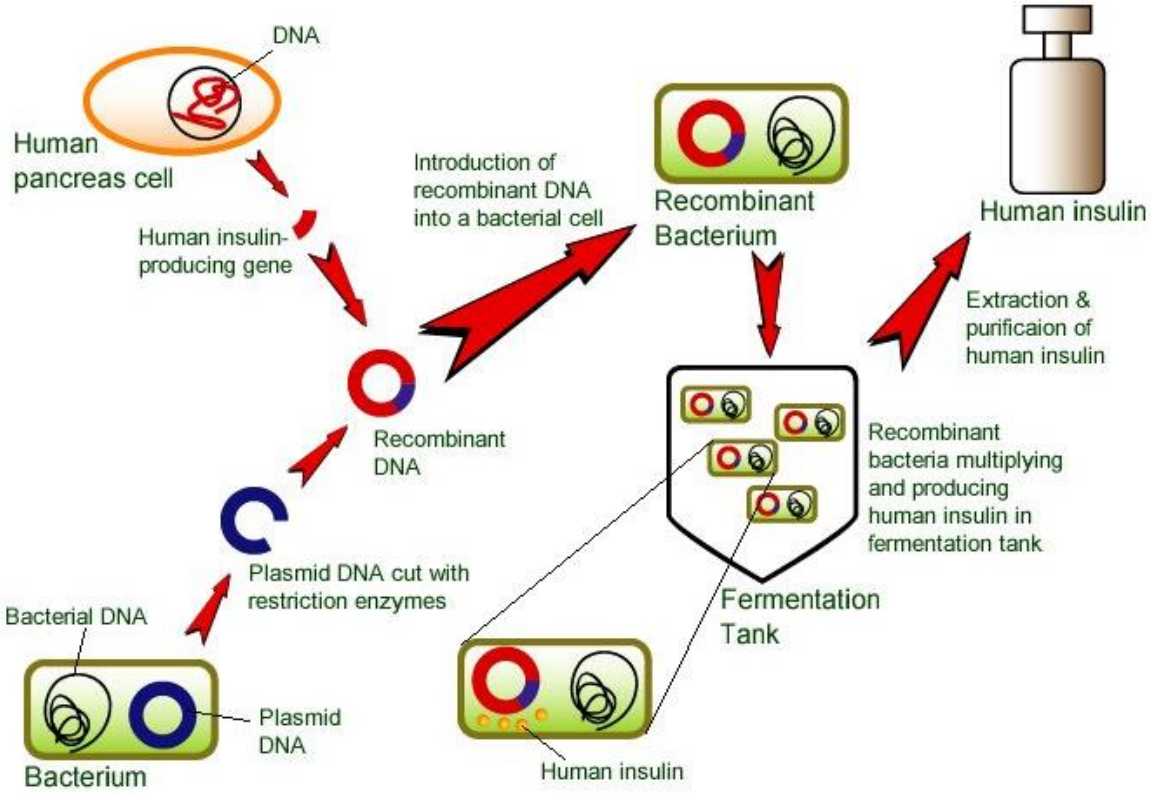
A produção de medicamentos biológicos é bem mais complexa que das drogas sintéticas devido à composição heterogênea dos componentes ativos dos organismos, capazes de interagir com as proteínas do corpo humano. Sendo assim, a biotecnologia revolucionou com a síntese de insulina no início da década de 80. Pesquisadores já haviam decodificado a sua estrutura química em meados da década de 50. Logo encontraram a localização exata do gene da insulina na parte superior do cromossomo 11. Em 1977, utilizando técnicas de Engenharia Genética, uma equipe de pesquisa havia inserido um gene do hormônio de rato em uma bactéria, que então produziu insulina. Dessa maneira, a insulina artificial ou recombinante foi o primeiro produto da tecnologia do rDNA comercializado em todo o mundo. A empresa de biotecnologia Genentech anunciou que havia produzido insulina ao introduzir o gene humano do hormônio em uma cepa de bactéria Escherichia coli. A Genentech formou parceria com a Eli Lilly & Co., o que trouxe a insulina humana ao mercado em 1982, com o nome comercial Humulin, a primeira droga recombinante no mundo (PIRES; CHACRA, 2008).

A construção do gene sintético para a pró-insulina humana foi iniciada a partir da sequência de aminoácidos dessa proteína. Utilizando - se os códons genéticos para *Escherichia coli* para uma melhor expressão do gene nessa bactéria, foi montado um gene codificando a proteína humana. Foi possível a bactéria produzir o hormônio insulina ao introduzir, com auxílio das técnicas de engenharia genética, o gene humano para a produção de insulina. Além disso, quando a bactéria se reproduz, o gene se duplica junto com o DNA da bactéria. Esse gene contém 18,6% de bases de códons substituídas, porém nenhuma das modificações feitas nos códons alterou o aminoácido de correspondência (LIMA, 2001). Na produção de insulina, o gene humano é isolado e recortado por enzimas de restrição e inserido no também isolado plasmídeo da Escherichia coli. Esses, pequenos anéis de DNA, possuem autonomia de replicação e alta capacidade de recombinação, permitindo que sejam muito utilizados na engenharia genética e funcionando como vetores de clonagem. A partir daí esse plasmídeo recombinante é formado e inserido na célula da bactéria, que codifica o gene humano da insulina, passando a produzi-la.

A célula transformada deve ser submetida às condições que facilitem a expressão do rDNA, resultando em grandes quantidades de insulina, que antes de serem comercializadas passam pelo processo de purificação (LIMA, 2001). Ela secreta o hormônio como proteína para o espaço entre a parede celular e a membrana plasmática bacteriana. A cuidadosa ruptura da parede celular, mantendo intacta a membrana interna, permite separar a insulina da maior parte das proteínas bacterianas, chegando-se assim a uma insulina de alta pureza.

A tecnologia do rDNA segundo Ferro (2010) permitiu a expressão de proteínas heterólogas em microrganismos e células hospedeiras. Em resumo a produção de insulina recombinante humana se dá conforme figura 1 :

Figura 1 - Produção de insulina recombinante humana



Fonte: BAESHEN et al., 2014 .

1- A insulina humana é extraída de células pancreáticas e o gene da produção de insulina é isolado.

2- Um DNA plasmidial é extraído de uma bactéria e cortado com enzimas de restrição, formando um plasmídeo vetor.

3- O gene humano da produção de insulina é inserido no vetor plasmidial para formar o DNA recombinante.
4- O DNA recombinante é introduzido em células bacterianas, formando as bactérias recombinantes.
5- As bactérias recombinantes multiplicam-se em um tanque de fermentação e produzem a insulina humana.
6- A insulina é extraída e purificada, pronta para uso (BAESHEN et al., 2014).

A biotecnologia permitiu que pacientes diabéticos tomassem insulina virtualmente idêntica à insulina natural humana. Isso reduz as possibilidades de complicações relacionadas ao sistema imunológico do paciente. Em estudos químicos e farmacológicos, a insulina humana recombinante provou ser indistinguível da pancreática. Inicialmente, a maior dificuldade encontrada era a contaminação do produto final pelas células hospedeiras. No entanto, esse perigo foi erradicado com a introdução dos processos de purificação. O produto final de insulina é sujeito a uma bateria de testes incluindo os melhores ensaios imunológicos para garantir que não haja nenhuma impureza (ITO, 2018).

A tecnologia de produção de insulina humana recombinante envolve a utilização por expressão da insulina *Escherichia coli* transgênica (E. coli), na qual o precursor da proteína é obtido por fermentação biológica e, então, processado e purificado. Após esses procedimentos, reações enzimáticas específicas transformam tal precursor em insulina humana. A técnica do DNA recombinante, é aplicada aos microrganismos produtores de enzima, inserindo no DNA destes o gene que codifica a proteína de interesse (ITO, 2018).

De acordo com Dellweg (1983 apud LIMA et al., 2001), a aplicação industrial está no cerne da biotecnologia, ao se utilizar organismos unicelulares para converter produtos e criar materiais. Atualmente, esse procedimento também é realizado utilizando células de leveduras, já que elas secretam uma molécula de insulina humana quase completa, com estrutura tridimensional perfeita. Isso minimiza a necessidade de procedimentos de purificação caros e complexos. A *Saccharomyces cerevisae* é a levedura predominante para produção de insulina em larga escala. Além das cepas de E. coli e leveduras, animais transgênicos e sistemas de expressão vegetais também podem ser empregados para a produção deste hormônio recombinante.

Na produção de componentes ativos de biofármacos, processos de isolamento e purificação para separá-las do restante do extrato formado para torná-las puras é muito importante. Para isso, essas etapas de isolamento e purificação acontecem, na maioria das vezes, sob temperaturas de 4 °C, podendo ser adequada aos equipamentos uma câmara fria, utilizando gelo, refrigeradores e congeladores. O uso de soluções-tampão também é essencial para regular o valor de pH, pois é um fator responsável pela atividade e desnaturação das proteínas. Seguidas as condições para a manutenção da atividade da enzima, de acordo com Ito (2018, p. 122) “os métodos de isolamento e purificação podem ser baseados em princípios físicos ou químicos, conforme apresentado a seguir:

- Solubilidade: depende das cargas das proteínas em um solvente aquoso sob determinadas condições. Cada proteína apresenta um valor de pH no qual suas cargas se anulam (carga positiva = carga negativa). Este valor de pH é conhecido como ponto isoelétrico, e nele as proteínas se tornam insolúveis, separando-se do restante do extrato aquoso. Como isso pode influenciar na atividade enzimática, é a técnica mais aplicada para separar proteínas contaminantes, ou seja, aquelas que não são de interesse durante o processo de produção das enzimas com potencial terapêutico.
- Carga: o principal método que utiliza as cargas da enzima para isolamento e purificação é a cromatografia. Esta técnica consiste em utilizar uma fase estacionária e uma fase móvel, onde se encontram as substâncias a serem separadas, e se baseia no fato de diferentes compostos apresentarem diferentes afinidades pela fase móvel e pela fase estacionária. Neste caso, pode ser aplicada uma cromatografia de troca iônica, que envolve a adsorção dos grupos carregados em resina da fase estacionária, fazendo com que as enzimas (moléculas carregadas) se desloquem mais lentamente pela coluna cromatográfica, enquanto que outras moléculas deixam acoluna mais rapidamente.
- Tamanho: a técnica baseada na separação de enzimas pelo tamanho também é aplicada à diferentes tipos de cromatografia, denominadas filtração em gel, cromatografia de exclusão em gel e cromatografia em gel. O princípio é o mesmo, de escoar uma fase móvel, que contém o extrato, por uma fase estacionária, desta vez uma fase estacionária com

porosidade definida e que permitirá a passagem das moléculas com velocidades diferentes. As moléculas menores penetram no gel e fazem todo o caminho por dentro dele, levando maior tempo para saírem da coluna e serem detectadas. As moléculas maiores permanecem junto ao solvente e passam por fora da coluna de gel, saindo e sendo detectadas mais rapidamente.

- Afinidade: a presença de sítio ativo específico nas enzimas pode ser explorada com o objetivo de isolamento e purificação. Utiliza-se um inibidor, um análogo do substrato ou um cofator, desde que a enzima tenha afinidade, para que ela se ligue a ele. Neste caso, temos a cromatografia por afinidade, uma vez que as proteínas ficam retidas ("grudadas") nos sítios ativos pelos quais têm afinidade. Cada ligante deve ser específico para a enzima que se deseja purificar".

A biotecnologia conforme NARDI (2002) no desenvolvimento da insulina artificial ou recombinante apresenta inúmeras vantagens como produção eficaz e específica, menos efeitos colaterais, menores riscos de contaminação por agentes infecciosos e produção em larga escala. Desta maneira os portadores do DM são beneficiados, trazendo de maneira rápida, barata e segura uma boa estratégia terapêutica da patologia levando assim a uma melhor qualidade de vida dos pacientes. Desde que foi sintetizada pela primeira vez, os pacientes diabéticos precisavam injetá-la com uma seringa diretamente na sua corrente sanguínea, sendo essa a única maneira de inserir o hormônio no corpo. Atualmente, pesquisadores têm buscado dispositivos e diferentes formas de insulina para serem utilizados como uma alternativa à seringa como: células produtoras de insulina, adesivos de insulina e, mais recentemente, um pâncreas artificial

Portanto, segundo RECH (2004) a tecnologia de DNA recombinante foi apenas o estopim das maravilhas que a biotecnologia é capaz de fazer para melhorar as condições de saúde de pacientes diabéticos. No cenário da corrida biotecnológica da indústria farmacêutica, nosso país se depara com grande barreira tecnológica por não dominar a fabricação de todos os princípios ativos utilizados nesses medicamentos, o que gera uma despesa de aproximadamente 4 bilhões de dólares com importação. Os produtos farmacêuticos sintetizados através dessa técnica atualmente são utilizados para tratar doenças como anemia, AIDS, câncer, deficiência do hormônio de crescimento, entre outras. Além disso, as estratégias de tratamento também são

melhoradas através do desenvolvimento de kits de diagnóstico, dispositivos de monitoramento e novas abordagens terapêuticas. A maioria dos medicamentos biotecnológicos é recombinante e esta pode ser a chave para o tratamento ou cura de outras doenças humanas letais, assim como foi para o diabetes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, procurou-se reportar o uso do conhecimento adquirido sobre a produção de insulina humana recombinante para o tratamento de diabetes mellitus, doença a qual está entre as que vem crescendo de maneira preocupante, gerando grande alarde na saúde pública. Nesse sentido, foi demostrado que a produção de insulina humana recombinante representou um marco no tratamento da diabetes mellitus e um alivio para seus portadores.

Abordou-se como fisiologicamente a insulina é secretada pelo pâncreas e sua importantíssima função no metabolismo de carboidratos no sangue. Sua ausência ou a deficiência é associada ao desenvolvimento de diabetes, enquanto seu excesso pode ocasionar quadros de hipoglicemia. No entanto, para chegar ao momento em que puderam tratar a diabetes com um preparado de insulina, os pesquisadores precisaram se basear em várias décadas de conhecimento acumulado por vários cientistas.

Esse trabalho foi muito importante para demostrar como a biotecnologia permitiu a pacientes diabéticos usar insulina virtualmente idêntica à insulina natural humana conforme estudos químicos e farmacológicos. Tal feito diminuiu as possibilidades de complicações relacionadas ao sistema imunológico do paciente, eficácia e custo do tratamento. Dessa maneira, o impacto positivo da fabricação da insulina humana recombinante foi demostrado através das pesquisas bibliográficas, demonstrando que a mesma contribui para a melhoria da qualidade de vida de muitos pacientes.

Conclui-se que os avanços da ciência e uso de tecnologias envolvendo biotecnologia estão possibilitando e fazendo surgir muitas contribuições positivas como formas de tratamento. Em 2014, a rigorosa agência federal dos Estados Unidos que rege a segurança de alimentos e medicamentos, a FDA (Food and Drug Administration), aprovou uma forma de insulina inalável, a Afrezza®. Já a empresa canadense de biotecnologia SemBiosys Genetics desenvolveu um açafrão transgênico (Carthamus tinctorius) capaz de acumular pró-insulina humana em suas sementes. Esses trabalhos contínuos, de pesquisadores que se sucedem pelas gerações, tem um valor inestimável e contribui para o desenvolvimento de linhas de pesquisa que vão incorporando novidades e se aprimorando à medida que o conhecimento avança.

REFERÊNCIAS

ARDUINO F. **O diabetes através dos tempos**. In: Arduino F. Diabetes mellitus e suas complicações. 2ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 1973. p. 1-4.

BAESHEN, N. A. et al., 2014. **Cell factories for insulin production.** Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203937/. Acesso em: 05 out. 2020.

BOSCHERO AC**. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas**. Arq Bras Endocrinol Metab 1996;40:149-55.

COTRAN, S. R. ; KUMAR, V. ; ROBBINS, S. L. Pâncreas. In: _____ . **Patologia básica**. 5. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 1994. Cap. 17.

FERRO, Emer Suavinho. **Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares**. Estudos avançados 24 , 2010. P. 40.

GASSEN, H.A.; BONACELLI, M.B.M.; SALLES-FILHO, S.L.M.; ODA, L.M.; SOARES,B.E.C.; MELLENTHIN, O.; CHAMAS, C.I.; WINNACKER, E.L. **Biotecnologia em Discussão**. Nº8. Cadernos Adenauer, 2000, p. 9-49.

ITO, Anirene Galvão Tavares Pereira. **Biotecnologia e Produção de Alimentos**. Londrina : Educacional, 2018.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica.** 5ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 2.ed. v. 3. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2001. p. 593.

LIMA, B. D. A produção de insulina humana por Engenharia Genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 23, Nov./Dez. 2001.

NARDI, N. B. Terapia Gênica. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, vol. 7, n. 1, p. 44-49, 2002.

PIRES, Antonio Carlos; CHACRA, Antonio Roberto. **A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1**: revisão. Arq. Bras. Endocrinol. Metab; 2008 .

PIRES, Antônio Carlos. et al. **Requerimento de Farmacovigilância para a Aprovação Regulatória de Biossimilares - Planos de Gerenciamento de Riscos**. In Biossimilar é diferente de Igual. São Paulo-Sp: Atlanta, 2013.

REIS, C. et al**. Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, Aplicações e Inserção na Indústria Farmacêutica**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, mar. 2009.

RECH, E. **A biotecnologia e o futuro da medicina**. II Especial Biotecnologia. SãoPaulo, 2004.

SILVA, M. E. R.; MORY, D.; DAVINI, E**. Marcadores genéticos e autoimunes do diabetes melito tipo 1: da Teoria para a Prática.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 166-180, mar. 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD) .**Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018.** São Paulo : Editora Clannad, 2017. Disponível em: https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf. Acesso em: 19 out. 2020.

TSCHIEDEL, Balduino et al. **Insulinas: insulinizando o paciente com diabetes. 2.** Ed. São Paulo: AC Farmacêutica, 2013. 248 p.

VIEIRA, Enio Cardillo. GAZZINELLI, Giovanni. GUIA, Marcos Mares. **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. 2ª edição.São Paulo: Editora Atheneus, 2002. p. 297.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, editor. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Genebra: World Health Organization; 2009.