



ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

GABRIEL DA SILVA DUARTE; ANTONIEL DE OLIVEIRA SOARES

RESUMO

A engenharia genética é uma área de grande importância para a tecnologia do DNA, uma vez que a sua criação possibilitou a realização do denominado corte da dupla fita hélice do DNA. Assim sendo, esse procedimento também é conhecido como enzimas de restrição ou endonucleases, visto que são uma classe de proteínas que se ligam ao DNA e cortam o arcabouço açúcar fosfato em uma sequência específica de ambos os filamentos da dupla hélice. Desse modo, o objetivo do presente estudo é demonstrar, tanto para o mundo da biologia como também para a comunidade científica, a importância das enzimas de restrição. Além disso, esta é uma pesquisa bibliográfica de caráter exploratório e qualitativo, a ser realizada por intermédio de buscas por artigos científicos nos bancos de dados: Lilacs e Scielo. Em conclusão, as enzimas desempenham a função de clivagem da molécula de DNA em pontos específicos, por meio do reconhecimento das sequências de nucleotídeos. Por fim, a pesquisa ratificou a relevância das enzimas de restrição para o desenvolvimento científico, já que são as ferramentas cruciais para a engenharia genética

Palavras-chave: Enzimas de restrição; DNA recombinantes; Engenharia genética

ABSTRACT

Genetic engineering has been crucial for DNA technological development, considering that its emergence made it possible for double-stranded DNA (dsDNA) breaks. Thus, that method is also known as restriction enzymes or endonucleases (REases). So, as a class of proteins, they can connect to the DNA and break the sugar-phosphate structure at a particular sequence on both sides of the dsDNA. Therefore, this article aims at demonstrating, not only to the biology environment but also to the scientific community, the importance of restriction enzymes. Furthermore, the applied methodological resource was the bibliographic research with an exploratory and qualitative approach, searched on scientific article databases such as Lilacs and Scielo. In conclusion, the restriction enzymes perform the function of cleaving the DNA molecule at specific site by recognizing the nucleotide sequences. Finally, the research highlighted the significance of the restriction enzymes for scientific development, once they are crucial instruments for genetic engineering.

Keywords: Restriction enzymes; recombinant DNA; Genetic engineering

1 INTRODUÇÃO

As enzimas de restrição provaram ser inestimáveis para o mapeamento físico do DNA. Eles oferecem oportunidades incomparáveis para diagnosticar o conteúdo de sequências de

DNA e são usados em campos tão díspares como forense criminal e pesquisa básica. De fato, sem enzimas de restrição, a indústria de biotecnologia certamente não teria florescido como tem. Os primeiros experimentos demonstrando a utilidade das enzimas de restrição foram realizados por Danna e Nathans e relatados em 1971. Este estudo pioneiro preparou o terreno para a prática moderna da biologia molecular na qual as enzimas de restrição são ferramentas onipresentes, embora muitas vezes sejam tidas como certas. (Roberts RJ 2005)

O artigo buscou abordar de forma ampla a atuação das enzimas de restrição, através de uma revisão bibliográfica de diversos artigos e literaturas sobre o tema. A revisão busca trazer desde o surgimento da engenharia genética, até os mais diversos assuntos acerca de enzimas de restrição.

Buscamos demonstrar que as enzimas de restrição são fundamentais para a manipulação do DNA. Para que o DNA recombinante seja originado é necessária a ação das enzimas de restrição. Denominadas de endonucleases de restrição, são enzimas bacterianas que reconhecem sequências de pares de bases específicas na molécula de DNA e as cortam nesses pontos. Pode-se dizer que são “tesouras moleculares”.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esta é uma pesquisa bibliográfica de caráter exploratório e qualitativo, a ser realizada por intermédio de buscas por artigos científicos nos bancos de dados: Lilacs e Scielo

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Surgimento da engenharia genética e seu papel na ciência

Em 1972 surgiram diversas descobertas que revolucionaram o estudo da genética, e permitiram o surgimento de uma nova ciência, a engenharia genética ou genética molecular. As mesmas são um conjunto de técnicas onde um determinado fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico) é isolado e os genes são purificados, examinados e manipulados.

A descoberta de enzimas que tinham a propriedade de clivar material genético em locais específico do gene, assim dividindo a fita dupla hélice do DNA em pedaços menores, as mesmas foram chamadas de Enzimas de restrição ou endonucleases.

3.2 Enzimas de restrição e DNA recombinantes

Essas enzimas são capazes de unirem e fragmentar o DNA (genes). Estas descobertas levaram a tecnologia de clonagem, que acontece através da purificação de genes ou cópia deles

por produzi-los em grandes números na bactéria hospedeira. Daí o DNA recombinante dominar as ciências biológicas e biomédicas, auxiliando com inúmeras técnicas utilizadas em diagnósticos de doenças genéticas, infecciosas e parasitárias.

A genética molecular pode ser utilizada para fazer com que genes estranhos sejam expressos em bactérias e leveduras, ou mesmos em outras células superiores. Com isso, farmacêuticos e agrários passaram a investir no desenvolvimento desta tecnologia. Contudo, foram desenvolvidas milhares de técnicas capazes de produzir diagnósticos extremamente sensíveis, e a correção de genes com erros inatos. A partir daí, sugeriram a fabricação de animais transgênicos, como por exemplo, a cabra gluca, que teve seu genoma modificado para obter algumas características de um indivíduo na direção planejada.

Bem, a escolha do DNA a ser usado como doador pode parecer óbvio, porém existem três possibilidades, dentre elas estão o DNA genômico que é obtido diretamente dos cromossomos do organismo em estudo, e o mesmo é a fonte mais direta de DNA. Ele precisa ser cortado antes que a clonagem seja possível. Em seguida o cDNA complementar que é uma versão bi filamentar de DNA de uma molécula de mRNA. E por fim, DNA quimicamente, nessa, as vezes o pesquisador deve incluir uma molécula de DNA recombinante numa sequência específica que por algum motivo não pode ser isolada do DNA genômico natural disponível ou cDNA. Para criar bactérias que expressam a insulina humana, o cDNA foi escolhido porque as bactérias não tem a habilidade de remover os íntrons presentes do DNA genômico natural.

3.3 Corte de DNA genômico

A maioria dos cortes é feito usando enzimas de restrição bacterianas, estas enzimas cortam em sequências, alvos específicos de DNA chamado de sítio de restrição, e essa propriedade é uma das características principais que tornam as enzimas de restrição adequada para manipulação do DNA, puramente por acaso qualquer molécula de DNA, seja ela derivada de um vírus, mosca ou humanos, as mesmas contém alvos de enzimas de restrição. Assim uma enzima de restrição cortará o DNA em um conjunto de fragmentos de restrição de determinadas localizações dos sítios de restrição.

Propriedade importante de algumas enzimas de restrição, é que elas fazem pontas adesivas. Vejamos um exemplo como as enzimas de restrição, da *ecoRI* que reconhece a seguinte sequência de seis pares de nucleotídeos no DNA de qualquer organismo:

5'- GAATTC-3'

3'-CTTAAG-5'

Ademais, esse tipo de segmento é chamado de palíndromo de DNA, significa que ambos

os filamentos tem a mesma sequência dos nucleotídeos, mas em orientações de polaridade inversa. De restrições diferentes corta sequências palindrômicas diferentes, às vezes os cortes estão na mesma posição e em cada um dos dois filamentos de polaridade inversa, entretanto as enzimas de restrição e mais outras fazem cortes que são escalonados. Por exemplo, enzimas da *ecoRI* faz cortes apenas entre os nucleotídeos G e A em cada filamento do palíndromo:



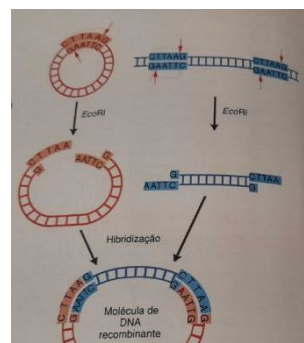
GAATTC CTTAAG



E estas cortes desencontradas deixa um par de pontas adesivas idênticas cada um sendo filamento único com cinco bases de tamanho, as plantas são chamadas de adesivos porque são uni filamentosares, elas podem fazer pares de bases, isto é, grudada com uma sequência complementar. O pareamento uni filamentar desses tipos, às vezes é chamado de hibridização. Em seguida ilustraremos a enzimas de restrição na *ecoRI* fazendo um único corte em uma molécula circular de DNA, tal como o plasmídeo. Bem as enzimas de restrição cortam o DNA em fragmentos de tamanhos manuseados e muitas delas eram pontas adesivas uni filamentosares adequadas para DNA recombinante.

Fig. 1 Formação de uma molécula de DNA recombinante.

A enzima de restrição *EcoRI* corta uma molécula de DNA circular tendo a sequência alvo, resultando em uma molécula linear com pontas adesivas unifilamentares. Devido a complementaridade, outras moléculas lineares cortadas com *EcoRI* tendo pontas adesivas podem se hibridizar com DNA circular linearizado, formando uma molécula de DNA recombinante.



GRIFFITHS, Anthony. *Introdução a Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

3.4 Tipo de DNA doador Amplificação dentro de uma bactéria.

A amplificação utiliza processos genéticos procariontes como é o caso da insulina, incluindo os de transformação bacteriana, replicação de plasmídeos e crescimento de bacteriófagos. Bem a clonagem da início com um único vetor recombinante que entra na bactéria e é amplificado pela replicação que ocorre na divisão celular. Normalmente existem

várias cópias de cada vetor em cada bactéria. Assim, após a amplificação, uma colônia de bactérias tipicamente conterá bilhões de cópias de uma única inserção de DNA fusionada a seu cromossomo acessório. Este conjunto de cópias amplificadas do único fragmento de DNA doador dentro do vetor de clonagem, é o clone do DNA recombinante. A replicação de moléculas recombinantes explora os mecanismos normais que a bactéria usa para replicar DNA cromossômico. Um requisito básico é a presença de uma origem de replicação de DNA.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, as enzimas desempenham a função de clivagem da molécula de DNA em pontos específicos, por meio do reconhecimento das sequências de nucleotídeos. Por fim, a pesquisa ratificou a relevância das enzimas de restrição para o desenvolvimento científico, já que são as ferramentas cruciais para a engenharia genética.

REFERÊNCIAS

GARCIA, Eloi. S.; CHAMAS, Claudia Inês. *Genética Molecular: avanços e problemas*. Cad. Saúde Publ., Rio de Janeiro, 12(1). 103-107, jan-mar. 1996. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/kSZHYfpvQhwnVq4R8tddFNn/?format=pdf&lang=pt>. Acessado em: 26 mar. 2022.

GRIFFITHS, Anthony. **Introdução a Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. MOREIRA, Catarina. **Enzima de Restrição**. Revista de Ciência Elementar. 2(2). 2014. Disponível m: https://pdfs.semanticscholar.org/92b9/d2cd2d5bd23eb8a943a9c85325191a6dc69e.pdf?_ga=2.250186694.1147306758.1649189658-1191048830.1649189658 . Acessado em: 25 mar. 2022. Acessado em: 27 mar. 2022.

ROBERTS RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):5905-8. doi: 10.1073/pnas.0500923102. Epub 2005 Apr 19. PMID: 15840723; PMCID: PMC1087929. Acessado em: 28 mar. 2022