

USO DO PLASMÍDEO pBR322 NA PROSPECÇÃO DE PUTATIVAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

VICENTE GOMES WIETH; ROSANE CRIZEL²; GIOVANA PAULA ZANDONA³;
VANESSA GALLI⁴; CESAR VALMOR ROMBALDI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – vicente.wieth@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – giovana.zandona@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Na busca por desenvolver métodos que se mostrem mais próximos da realidade e do efeito autêntico que certo composto produz quando presente num sistema biológico, diversas etapas são necessárias. Para isso, existem técnicas e análises que permitem comprovar a causa de um fenômeno, em escalas controladas, e então fortalecer a falseabilidade da hipótese vigente. Dentre as primeiras etapas, nas análises *in vitro*, a caracterização de atividade antioxidante total de um composto pode ser feita através do radical DPPH (SINGLETON; ROSSI; JR, 1965), pelo radical ABTS⁺(NENADIS et al., 2004), pelo radical Hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987) ou por FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Essas técnicas são as mais propagadas, contudo, existem outras técnicas, baseadas noutros princípios, que podem contribuir para dar maior robustez ao teste de hipótese.

Dependendo da finalidade a que se propõe o estudo, uma opção a ser considerada é a “técnica para avaliar a inibição de dano induzido ao DNA”, que avalia a protetividade do composto frente ao dano oxidativo induzido por H₂O₂ ao DNA. Como reportado em artigo de 1989, foi utilizado o plasmídeo pBR322 e o vírus Phi X 174 para comprovar que a molécula de oxigênio singlete danifica a estrutura do DNA, fazendo-o perder sua conformação funcional. Os pesquisadores reportam, ainda, que a base nitrogenada mais afetada por esta molécula é a guanina (DI MASCIO et al., 1989).

A fita de DNA de um plasmídeo pode se apresentar nas seguintes conformações: circular fechada/enovelada (*close circular/supercoiled*), circular aberta (*open circular*) ou linear (*linear*). O pBR322 apresenta uma conformação circular fechada enovelada, sendo essa uma característica fundamental para que o princípio da técnica funcione: a constatação se o composto de interesse impediu a alteração da conformação da fita para um modelo circular aberto.

Entretanto, nos dias atuais, diversos outros plasmídeos possuem essa e outras características muito bem catalogadas, trazendo assim o objetivo dessa revisão bibliográfica: conhecer o histórico de utilizações e eventuais adaptações da avaliação da inibição de dano induzido ao DNA e verificar se é efetiva a utilização de outros plasmídeos, além do pBR322 para a realização da mesma.

2. METODOLOGIA

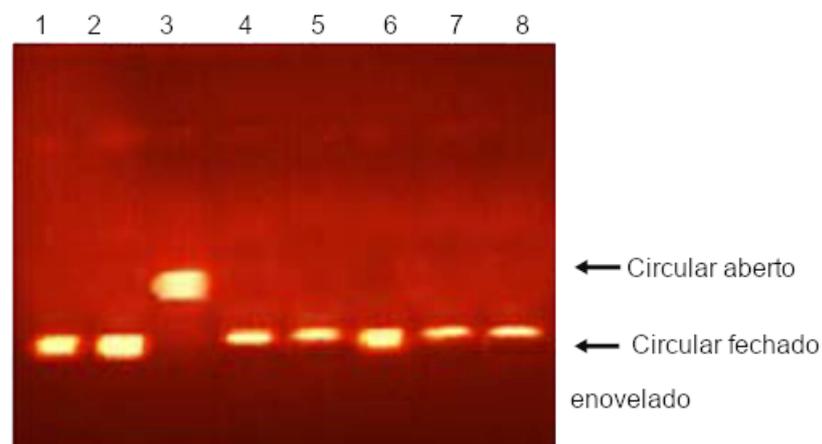
A revisão bibliográfica foi feita através das ferramentas de pesquisa de periódicos e textos científicos Google Acadêmico, Periódicos Capes, NCBI e Science Direct. Sendo uma revisão histórica, a pesquisa em cada base, foi feita utilizando trabalhos publicados de 1989 até 2020, no idioma inglês, e somente artigos de pesquisa e revisão. As palavras-chave utilizadas foram: “pBR322”, “DNA Damage

assay”, “oxidative damage”, “supercoiled DNA”, “Plasmid oxidative protection” e “review”. Após o levantamento de dados, cerca de 800 artigos sobre o tema foram apresentados, sendo assim selecionados 32 artigos que abordavam plenamente o tema proposto e entre eles, 15 trabalhos foram selecionados para serem sumarizados e discutidos no presente estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme catalogado e divulgado por Balbás e colaboradores (1986), o pBR322 é um plasmídeo criado originalmente da clonagem recombinante em *Escherichia coli*, a partir da série pBR312, com a finalidade de ser um aparato para clonagem e para o estudo de replicação e transcrição de células procarióticas.

A primeira metodologia relatada para observar o dano oxidativo à fita de plasmídeo é de Di Mascio e colaboradores (1989). Nesse estudo, é possível observar a utilização de NDPO₂ para a produção do oxigênio singlete que ameaça a quebra da conformação da fita de DNA do plasmídeo pBR322 e do vírus Phi X 174. Com isso, metodologias para avaliação do dano ao DNA foram propostas nos anos seguintes, como é o caso de Devasagayam e colaboradores (1995), e que utilizaram as mesmas concentrações e reagentes que Di Mascio e sua equipe. Entretanto, a técnica passou por alterações com o passar dos anos, e aquela mais comumente encontrada nos artigos atuais é do estudo reportado por Zhao e colaboradores (2005), onde os pesquisadores alteraram a solução indutora da oxidação pela solução de H₂O₂ e presença de Fe²⁺ que atuam através da reação de Fenton oxidando o ferro para Fe³⁺ e liberando dois átomos de oxigênio singlete no processo. Como exemplo do uso dessa condição, há o trabalho que avaliou o potencial protetivo de derivados de aminotiazol frente ao dano oxidativo em DNA pBR322 e observaram uma eficiência do composto em manter a conformação original da fita de DNA já em concentrações de 0,5 mM do composto (figura 1) (KALPANA; SRINIVASAN; MENON, 2008).



Linha 1: DNA pBR322 normal
Linha 2: DNA pBR322 + derivado de aminotiazol [1,5 mM]
Linha 3: DNA pBR322 + 30 mM H₂O₂
Linha 4: DNA pBR322 + derivado de aminotiazol [0,5 mM] + 30 mM H₂O₂
Linha 5: DNA pBR322 + derivado de aminotiazol [1,0 mM] + 30 mM H₂O₂
Linha 6: DNA pBR322 + derivado de aminotiazol [1,5 mM] + 30 mM H₂O₂
Linha 7: DNA pBR322 + derivado de aminotiazol [2,0 mM] + 30 mM H₂O₂
Linha 8: DNA pBR322 + derivado de aminotiazol [2,5 mM] + 30 mM H₂O₂

Figura 1. Gel de Agarose do plasmídeo pBR322 tratado com diferentes soluções (Adaptado de KALPANA; SRINIVASAN; MENON, 2008).

Diversos pesquisadores já relataram a ação de compostos na proteção de moléculas de DNA plasmidial, utilizando o plasmídeo pBR322; alguns exemplos desses estudos estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Compostos e sua concentração mínima observadas para a protetividade da fita de DNA plasmidial

Composto	Concentração mínima para efeito maior que 50%	Massa de pBR322 utilizada	Composto indutor do dano e sua concentração	Referência
Miricetina	100 μ M	2 - 3 μ g	40 mM NDPO ₂	(DEVASAGAYAM et al., 1995)
Ácido Tânico	100 μ M	2 - 3 μ g	40 mM NDPO ₂	(DEVASAGAYAM et al., 1995)
Verbascósido	5.000 μ M	129,52 μ g	20 mM H ₂ O ₂	(ZHAO et al., 2005)
Hesperidina	1.000 μ M	2 - 3 μ g	30 mM H ₂ O ₂	(KALPANA; SRINIVASAN; MENON, 2009)
Pterostilbeno	1.500 μ M	129,52 μ g	20 mM H ₂ O ₂	(ACHARYA; GHASKADBI, 2013)

Além da indução de oxigênio singlete através de soluções de H₂O₂ e NDPO₂, existem diversos estudos que induzem o dano ao DNA por métodos de irradiação de raios gama. Esse é o caso do trabalho que avaliou os efeitos protetivos da Catequina EGCG de Chá Verde (*Camellia sinensis*) contra o dano induzido por radiação gama em DNA pBR322 (RICHI; KALE; TIKU, 2012). Ou de Kumar e colaboradores (1999) que avaliaram o efeito protetivo da Clorofilina e seu possível mecanismo de ação para a proteção do plasmídeo pBR322 frente ao dano induzido por radiação. Outra alteração na metodologia que vale ser mencionada, é aquela proposta por Rodriguez e Akman,(1998) e também utilizada por Kumar e colaboradores (2006), onde o material genético utilizado é *Calf Thymus* DNA, material esse que também possui a característica de ser circular fechado/enovelado.

4. CONCLUSÕES

O pBR322, com a seleção de um bom agente oxidante, se constitui numa alternativa interessante para predizer o potencial protetivo de um determinado compostos ou matriz de compostos. Em função dos achados nessa pesquisa bibliográfica, esse conceito será incluso na listagem de variáveis dependentes (caso contribua para dar robustez ao teste de hipótese) dos projetos de pesquisa dos autores que assinam este trabalho.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, J. D.; GHASKADBI, S. S. Protective effect of Pterostilbene against free radical mediated oxidative damage. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.
- BALBÁS, P. et al. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. **Gene**, v. 50, n. 1–3, p. 3–40, 1986.
- DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Protection of plasmid pBR322 DNA by flavonoids against single-strand breaks induced by singlet molecular oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 30, n. 2–3, p. 97–103, 1995.
- DI MASCIO, P. et al. Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks. **BBA - Gene Structure and Expression**, v. 1007, n. 2, p. 151–157, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, n. 1, p. 215–219, 1987.
- KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V. P. Antioxidant potential of aminothiazole derivative and its protective effect on H₂O₂-induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 314, n. 1–2, p. 95–103, 2008.
- KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V. P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 323, n. 1–2, p. 21–29, 2009.
- KUMAR, G. S. et al. Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Emblca officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 5, p. 446–452, 2006.
- KUMAR, S. S. et al. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 425, n. 1, p. 71–79, 1999.
- NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669–4674, 2004.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.
- RICHI, B.; KALE, R. K.; TIKU, A. B. Radio-modulatory effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 1, p. 62–70, 2012.
- RODRIGUEZ, H.; AKMAN, S. A. Mapping oxidative DNA damage at nucleotide level. **Free Radical Research**, v. 29, n. 6, p. 499–510, 1998.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- ZHAO, C. et al. “In vitro” protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1723, n. 1–3, p. 114–123, 2005.