

Philippe Gabriel

**EFEITO DA ALTERAÇÃO NA SEGUNDA ESFERA DE  
COORDENAÇÃO DE COMPLEXOS BINUCLEARES DE  
Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> e Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup> COMO MODULADOR DA ATIVIDADE DE  
CLIVAGEM E INTERAÇÃO COM DNA**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Hernán Terenzi.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gabriel, Philippe

EFEITO DA ALTERAÇÃO NA SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO DE  
COMPLEXOS BINUCLEARES DE Fe(III)Zn(II) e Fe(III)Cu(II)  
COMO MODULADOR DA ATIVIDADE DE CLIVAGEM E INTERAÇÃO COM  
DNA / Philippe Gabriel ; orientador, Hernan Terenzi -  
Florianópolis, SC, 2016.

156 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Clivagem de DNA. 3. Nucleases  
sintéticas. 4. Biomiméticos. 5. Fosfatases ácidas  
púrpuras. I. Terenzi, Hernan . II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III.  
Titulo.

Philippe Gabriel

**EFEITO DA ALTERAÇÃO NA SEGUNDA ESFERA DE  
COORDENAÇÃO DE COMPLEXOS BINUCLEARES DE  
Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> e Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup> COMO MODULADOR DA ATIVIDADE DE  
CLIVAGEM E INTERAÇÃO COM DNA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Bioquímica”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 02 de dezembro de 2016.

---

Prof<sup>a</sup>. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Dra.  
Coordenador do Curso

---

Prof. Hernan Terenzi, Dr. – Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Ademir Neves, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup> Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Claus Tröger Pich, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Hernán pela oportunidade, pela confiança, e pelo aprendizado acadêmico e pessoal que me proporcionou um crescimento profissional imenso nestes últimos anos, muito obrigado.

À minha família que me deu todo o suporte necessário, que possibilitou a minha formação, sempre me incentivou e me acolheu, foi nos abraços de vocês que sempre recarreguei minhas energias. Amo muito vocês Juci, Marisângela e Kamila.

Ao Luiz Fernando, por tornar tudo isso possível, por segurar todas as pontas, por toda a paciência, compreensão, e carinho, meu muito obrigado, amo você!

Ao professor Dr. Ademir Neves, ao Dr. Tiago Pacheco e à doutoranda Renata da Silva do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina por fornecerem os complexos utilizados neste trabalho e por todo o suporte.

Aos amigos do Centro de Biologia Molecular Estrutural: Ana Karoline, Angela, Elis, Gabriel, Graciela (agregada), Henrique, Hugo, Léo, Martina, Ruth, Vanessa, Vânia e especialmente a Nathi, que sempre me auxiliou nos experimentos e nas discussões de resultados, além de ter se tornado uma grande amiga.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela disponibilização de toda a estrutura e ensino. À CAPES pela concessão da bolsa, e ao CNPq, MCT, FINEP, FAPESC e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) pelo financiamento direto e indireto deste trabalho.



“Se a aparência e a essência das  
coisas coincidissem, a ciência  
seria desnecessária. ”

Karl Marx





## RESUMO

O desenvolvimento de novas moléculas que auxiliam a manipulação de ácidos nucleicos é um tema que vem sendo alvo de grandes estudos nas áreas de bioquímica, biologia molecular, biotecnologia e química bioinorgânica, onde se buscam complexos que apresentam interação e/ou clivagem de ácidos nucleicos. Nestas áreas busca-se cada vez mais um modo de aprimoramento e incremento da seletividade destes complexos por regiões específicas do DNA. Dentro deste contexto, neste trabalho foram avaliados os potenciais de interação e clivagem de DNA através de 5 complexos binucleares biomiméticos derivados de fosfatases ácida púrpura, tomando como base o complexo FeZn-L0 e adicionando cadeias carbônicas de diferentes tamanhos com diaminas, como um modo de mimetizar a segunda esfera de coordenação da enzima. Todos os cinco complexos foram capazes de clivar o DNA plasmidial de um modo concentração-dependente. A variação do pH alterou significativamente a atividade destes complexos, o que indicou um mecanismo de clivagem semelhante àquele sugerido para a hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP. Todos os complexos tiveram sua atividade inibida quando adicionado à reação concentrações crescentes dos sais NaCl e LiClO<sub>4</sub>, indicando que a neutralização das cargas do DNA pelos íons Na<sup>+</sup> afeta diretamente o processo de catálise. Nenhum dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio utilizados neste trabalho foram capazes de alterar a clivagem do DNA pelos complexos, sugerindo um mecanismo de atividade sem a participação de oxigênio, fato confirmado posteriormente pelo ensaio de clivagem na ausência de oxigênio em atmosfera de argônio. Foi possível perceber ainda que os complexos que apresentam as maiores cadeias carbônicas possuem uma preferência de interação com DNA através do sulco maior, sendo que o complexo que possui a menor cadeia carbônica não apresentou especificidade por ambos os sulcos, porém necessitou acessar o DNA por um destes. O complexo que não possui cadeia carbônica, por sua vez, apresentou uma preferência de interação ao DNA através do sulco menor. As constantes cinéticas encontradas neste trabalho mostraram que a inserção destas cadeias carbônicas ao complexo aumentou em até 5.5 vezes a eficiência catalítica dos mesmos. O ensaio de difração circular demonstrou que todos os complexos estudados foram capazes de alterar a estrutura secundária do DNA, diminuindo sua helicidade e o empilhamento de bases, fenômeno encontrado na literatura por moléculas que são capazes de acessar o DNA através dos sulcos maior ou menor. Por fim, ensaios de interação dos complexos com oligonucleotídeos demonstraram através da técnica de

*footprinting* que os complexos são capazes de interagir com esta molécula e dificultar a clivagem do DNA pelo Fe-EDTA, principalmente em locais onde predominam bases pirimídicas, sugerindo uma especificidade destes complexos por estas regiões. De modo geral, a inserção de cadeias carbônicas como um modo de mimetizar uma segunda esfera de coordenação nestes complexos é uma estratégia viável para potencializar a atividade destas moléculas artificiais quanto a interação e clivagem de DNA.

**Palavras-chave:** Clivagem de DNA; Nucleases sintéticas; Biomiméticos; Fosfatases ácida púrpura; DNA *footprinting*.

## ABSTRACT

The development of new molecules that aid in the handling of nucleic acids has been the subject of many studies in the fields of biochemistry, molecular biology, biotechnology and bioinorganic chemistry, searching for complexes that are capable of interacting and/or cleaving these molecules. These studies focus on the increase and enhancement selectivity of complexes to specific regions of DNA. In this context, this study evaluated the potential of interaction and cleavage of DNA by 5 biomimetic binuclear complexes derived from acid purple phosphatases, where, based on FeZn-L0 complex, carbon chains of different sizes containing diamines were added, in order to mimic the second coordination sphere of the model enzyme. All five compounds were able to cleave plasmid DNA in a concentration-dependent manner. Variations of pH changed significantly the activity of these complexes, which indicated a similar cleavage mechanism to the one suggested for the hydrolysis of the model substrate 2,4-BDNPP. All complexes had their activity inhibited by the addition of increasing concentrations of NaCl and LiClO<sub>4</sub> salts to the reaction, indicating that neutralization of DNA charges by Na<sup>+</sup> ions directly affects the catalysis process. None of the scavengers of reactive oxygen species used in this study were able to change the cleavage of DNA, suggesting activity reaction mechanism without the participation of oxygen, a fact later confirmed by the cleavage assay in the absence of oxygen. It was perceived that the complexes having longer carbon chains had a preferably interaction to DNA through the major groove. The complex with smaller carbon chain displayed no specificity for both grooves, but still required access to the grooves to bind with DNA. The kinetic constants found in this study indicated that the inclusion of these carbon chains to the complex increased by up to 5.5 times the catalytic efficiency of the complexes. The circular dichroism assay demonstrated that all studied complexes were able to alter the secondary structure of DNA, by reducing its helicity and base stacking, a phenomenon found in the literature on molecules that are able to access the DNA through major or minor grooves. Lastly, interaction assays between complex and oligonucleotides, evaluated by a hydroxyl radical footprinting technique, showed that the complexes are capable of interacting and hinder cleavage of DNA by Fe-EDTA generated hydroxyl radicals, particularly in regions rich in pyrimidine bases, suggesting a specificity of these complexes to these regions. In general, the inclusion of carbon chains as a way to mimic the second coordination sphere in

these complexes is a viable strategy to potentiate the activity of these artificial molecules to interact and cleave DNA.

**Keywords:** DNA cleavage; Synthetic Nucleases; Biomimetic; Purple Acid Phosphatase; DNA footprinting.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional do DNA mostrando a interação entre os nucleotídeos, o esqueleto açúcar-fosfato e os sulcos maiores e menores da molécula. Adaptado de (Horton, 2006).....	31
Figura 2. À esquerda estrutura geral de um nucleotídeo; à direita estrutura das diferentes bases nitrogenadas do DNA e RNA. Adaptado de (Lodish H, 2000). .....	32
Figura 3. Modelo de ligação fosfodiéster (Nelson e Cox, 2014).....	33
Figura 4. Comparação das formas A, B e Z do DNA (Nelson e Cox, 2014). ....	35
Figura 5. DNA plasmidial. (A) Esquema que mostra a estrutura do DNA superenovelado. (B) Micrografia eletrônica mostrando moléculas de DNA relaxados (FII) e superenovelados (FI). O grau de enovelamento aumenta de cima para baixo. Adaptado de (Nelson e Cox, 2014). ....	37
Figura 6. Representações esquemáticas dos três modos principais de interação de moléculas com o DNA. O ligante é mostrado em vermelho e as cadeias de DNA em preto: (a) Interação eletrostática. (b) intercalação. (c) Ligação pelos sulcos (Blackburn, 2006). ....	39
Figura 7. Representação da estrutura dos complexos Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) (A) e Cu(II)-([9]aneN3)Cl <sub>2</sub> (B). Hegg e Burstyn (1998) Sigman (1979). ....	41
Figura 8. Esquema proposto para o mecanismo oxidativo de clivagem do DNA. Adaptado de Sigman et al., 1979. ....	42
Figura 9. Mecanismo de clivagem hidrolítica de DNA, mostrando o ataque nucleofílico resultando na quebra das fitas e liberando os terminais R-OH e R-O-PO <sub>3</sub> (Mancin et al., 2005).....	43
Figura 10. Representação do sítio ativo da fosfatase ácida púrpura de feijão vermelho, mostrando os resíduos de aminoácidos que coordenam com os metais (Schenk <i>et al.</i> , 2013). ....	45
Figura 11. Esquema representando as esferas de coordenação de um complexo metálico e as forças envolvidas em cada uma das esferas. Adaptado de (Lewis, 2013).....	47
Figura 12. Ilustração do sítio ativo da metaloenzima staphylococcal nucleasse. O cofator, a segunda esfera de coordenação e o substrato estão marcados em preto, azul e vermelho respectivamente (Zhao <i>et al.</i> , 2013). ....	48
Figura 13. Representação estrutural dos complexos FeZn-L0 (A), FeZn-L2 (B), FeZn-L4 (C), FeZn-L6 (D) e FeCu-Lc (E). ....	57

Figura 14. Ilustração das três formas do DNA plasmidial e sua separação em gel de agarose, mostrando as diferenças estruturais e de mobilidade eletroforética (Bortolotto, 2015). .....58

Figura 15. Representação da sequência do oligonucleotídeo de ATCG utilizado neste trabalho. Em vermelho e verde destacam-se as regiões ricas em AT e GC, respectivamente. Em amarelo, localiza-se o *hairpin loop* de TTTT. O FAM refere-se ao grupo fluorescente fluoresceína ligada à extremidade 5'-fosfato do DNA. ....68

Figura 16. Representação de um gel de poliacrilamida desnaturante contendo amostras de um ensaio de *footprinting* de DNA por Fe-EDTA. A primeira canaleta possui somente o DNA tratado com o complexo Fe-EDTA. Junto a esta amostra seguem as amostras de DNA que foram tratadas com Fe-EDTA na presença de concentrações crescentes de um determinado ligante, como um complexo metálico. É possível perceber que com o aumento da concentração do ligante ocorre uma diminuição da clivagem de algumas bandas pelo Fe-EDTA. Estes locais de menor clivagem aparentam uma proteção do DNA pelo ligante, podendo inferir que estes são os sítios de interação destas moléculas com o DNA. Adaptado de Urbach e Waring, (Urbach e Waring, 2005). .....72

Figura 17. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L0 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25µM; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a 10µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....76

Figura 18. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L2 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25µM; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a 10µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....76

Figura 19. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L4 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25µM; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a 10µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....77

Figura 20. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L6 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25µM; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a 10µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....77

Figura 21. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeCu-Lc em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25µM; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a 10µM; Temperatura = 50°C; Tempo

= 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....78

Figura 22. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L2 com variação de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim$ 25 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM; (MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES pH 9.0); [Complexo FeZn-L2] = 5 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....81

Figura 23. Proposta do mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo FeZn-L4. Na primeira etapa o substrato coordena-se ao centro de Zn<sup>II</sup> pelo deslocamento de uma molécula de água. Em seguida o íon hidróxido presente no centro de Fe<sup>III</sup> atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a consequente liberação do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico. Retirado de Camargo (2013). ....82

Figura 24. Clivagem de DNA plasmidial com variação de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim$ 25 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM; (MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES pH 9.0); [Complexo FeCu-Lc] = 5 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....83

Figura 25. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim$ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ..85

Figura 26. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim$ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao a abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ..86

Figura 27. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim$ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ..86

Figura 28. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim$ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ..87

Figura 29. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ..87

Figura 30. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....89

Figura 31. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....89

Figura 32 . Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....90

Figura 33. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....91

Figura 34 . Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ....91

Figura 35. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [Net] ou [VM] = 50µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....94



Figura 36. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [Net] ou [VM] = 50µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	94
Figura 37. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [Net] ou [VM] = 50µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	95
Figura 38. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [Net] ou [VM] = 50µM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	95
Figura 39. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeCu-Lc, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [Net] ou [VM] = 50 µM; Temperatura = 50 °C; Tempo = 8 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	96
Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L0. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200µM; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181µM; Temperatura = 20°C.....	97
Figura 41. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L2. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200µM; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181µM; Temperatura = 20°C.....	98
Figura 42. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L4. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200µM; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181µM; Temperatura = 20°C.....	98
Figura 43. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L6. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200µM; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181µM; Temperatura = 20°C.....	99

Figura 44. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeCu-Lc. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200µM; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181µM; Temperatura = 20°C. .... 99

Figura 45. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II na presença de agente redutor. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 5µM; [Ascorbato] = 50µM; Temperatura = 37°C; Tempo = 1h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .... 103

Figura 46. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .... 106

Figura 47. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .... 106

Figura 48. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .... 107

Figura 49. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .... 107

Figura 50. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeCu-L6, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25µM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5µM; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .... 108

Figura 51. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZn-L0, FeZn-L2, FeZn-L4, FeZn-L6 e FeCu-Lc em aerobiose ou anaerobiose. Condições

reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 5 $\mu$ M; [FeEDTA] = 50 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 2h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....110

Figura 52. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeZn-L0, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.....112

Figura 53. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeZn-L2, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.....112

Figura 54. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeZn-L4, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.....113

Figura 55. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeZn-L6, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.....113

Figura 56. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeCu-Lc, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.....114

Figura 57. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L0. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....119

Figura 58. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L2. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....120

Figura 59. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L4. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0);

[complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. .... 121

Figura 60. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L6. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. .... 122

Figura 61. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeCu-Lc. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [com-plexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. .... 123

Figura 62. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L2 na presença de agente redutor. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; [Ascorbato] = 50  $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. .... 125

Figura 63. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L2 na presença de agente redutor com destaque às regiões que apresentam bandas duplas como resultado de oxidação de nucleotídeos. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; [Ascorbato] = 50  $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. .... 126

Figura 64. Esquema que representa a clivagem do DNA através do complexo Fe<sup>II</sup>-Bleomicina, mostrando a oxidação do C'4 da desoxirribose através de um rearranjo do radical peroxil ou peróxido formados pelo oxigênio molecular, resultando na clivagem do anel da desoxirribose e a abertura da pentose, gerando a fragmentação da molécula DNA liberando uma extremidade 5'-fosfato e uma 3'-fosfoglicolato, além da base-propenal (Pogozelski e Tullius, 1998). .... 127

Figura 65. Footprinting por Fe-EDTA do oligonucleotídeo ATCG titulado com diferentes concentrações dos complexos FeZn-L0 (A) e FeZn-L2 (B). Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 90 segundos ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. .... 129

Figura 66. Footprinting por Fe-EDTA do oligonucleotídeo ATCG titulado com diferentes concentrações dos complexos FeZn-L4 (A) e FeZn-L6 (B) e FeCu-Lc (C). Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 90 segundos ao

abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. ....130

Figura 67. Representação da sequência do oligonucleotídeo de ATCG utilizado neste trabalho evidenciando as regiões (sítios) protegidos pelos complexos com centro metálico FeZn na presença de Fe-EDTA. Em vermelho e verde destacam-se as regiões ricas em AT e GC, respectivamente. Em amarelo, localiza-se o *hairpin loop* de TTTT. O FAM refere-se ao grupo fluorescente fluoresceína ligada à extremidade 5'-fosfato do DNA. ....133



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação da inibição da atividade de clivagem pelos complexos FeZn-L0, FeZn-L2, FeZn-L4, FeZn-L6 e FeZn-Lc quando expostos as maiores concentrações de NaCl e LiClO<sub>4</sub> testadas (50mM).....92

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem dos complexos FeZn-L0/L2/L4/L6 e FeCu-Lc. Constante catalítica ( $k_{cat}$ ), constante de afinidade ( $K_M$ ), eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ),  $k_{cat}/k_{unc}$ , e fator de incremento da atividade vs FeZn-L0 obtida com os complexos FeZn-L2/L4/L6 e FeCu-Lc pelos dados cinéticos de eficiência catalítica. ....115





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-BDNPP	Bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato
APS	Persulfato de Amônio (do inglês, <i>Ammonium Persulfate</i> )
CD	Dicroísmo circular (do inglês, <i>circular dichroism</i> )
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico
CT-DNA	Do inglês: <i>calf thymus DNA</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FI	Forma superenovelada do DNA plasmidial
FII	Forma circular aberta do DNA
FIII	Forma linear do DNA
FAM	6-fluoresceína
HEPES	( <i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanossulfônico)
NET	Netropsina
MES	Ácido 2-( <i>N</i> -morfolino) etanossulfônico monohidratado
pBSK-II	Plasmídeo pBlueScript II
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
TRIS-HCl	Hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano
UV-VIS	Ultravioleta visível
VM	Verde de Metila



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
1.1	UM BREVE HISTÓRICO SOBRE O DNA .....	29
1.2	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO .....	30
1.3	A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DNA .....	34
1.4	DNA PLASMIDIAL .....	35
1.5	INTERAÇÃO DE PEQUENAS MOLÉCULAS COM O DNA .....	38
1.6	NUCLEASES .....	39
1.7	FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS .....	44
1.8	ESFERAS DE COORDENAÇÃO .....	46
1.9	APLICAÇÕES .....	49
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	53
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	53
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	55
3.2	COMPLEXOS EM ESTUDO .....	55
3.3	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	57
3.4	CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL .....	59
3.4.1	<b>Procedimento geral .....</b>	<b>59</b>
3.4.2	<b>Efeito da concentração dos complexos.....</b>	<b>60</b>
3.4.3	<b>Efeito do pH.....</b>	<b>60</b>
3.5	ANÁLISE DOS MODOS DE INTERAÇÃO .....	61
3.5.1	<b>Efeito da força iônica .....</b>	<b>61</b>
3.5.2	<b>Efeito dos ligantes de sulco.....</b>	<b>62</b>
3.5.3	<b>Interação com CT-DNA .....</b>	<b>63</b>
3.6	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE CLIVAGEM.....	64
3.6.1	<b>Efeito da clivagem na presença de um agente redutor .....</b>	<b>64</b>
3.6.2	<b>Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio.....</b>	<b>65</b>
3.6.3	<b>Efeito da ausência de oxigênio .....</b>	<b>65</b>
3.7	CINÉTICA DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL.....	66
3.8	INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS..	67
3.8.1	<b>Clivagem direta de oligonucleotídeos.....</b>	<b>67</b>
3.8.2	<b>Clivagem direta na presença de um agente redutor .....</b>	<b>69</b>
3.8.3	<b>Footprinting de DNA por Fe-EDTA .....</b>	<b>70</b>

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
4.1	CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL.....	75
4.1.1	Efeito da concentração dos complexos.....	75
4.1.2	Efeito do pH .....	80
4.2	ANÁLISE DOS MODOS DE INTERAÇÃO .....	84
4.2.1	Efeito da força iônica.....	84
4.2.2	Efeito dos ligantes de sulco .....	92
4.2.3	Interação com CT-DNA .....	97
4.3	AValiação DO MECANISMO DE CLIVAGEM.....	101
4.3.1	Efeito da clivagem na presença de um agente redutor .....	102
4.3.2	Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio 104	
4.3.3	Efeito da ausência de oxigênio .....	108
4.4	CINÉTICA DE CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL.....	111
4.5	INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	117
4.5.1	Clivagem direta de oligonucleotídeos.....	117
4.5.2	Clivagem direta na presença de um agente redutor .....	124
4.5.3	Footprinting de DNA por Fe-EDTA .....	128
5	CONCLUSÕES .....	135
6	PERSPECTIVAS .....	139
	REFERÊNCIAS .....	141

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE O DNA

A história do material genético remonta ao século XIX quando, em 1833, Brown descreveu o núcleo celular pela primeira vez (Brown, 1833). Posteriormente, em 1839, Shleiden e Schwann propuseram a teoria celular, definindo a célula como uma unidade morfofisiológica, independente e portadora de autonomia de replicação, ideias publicadas em seu livro em 1847 (Schwann, 1847). Em 1869, Miesher, ao buscar os componentes químicos do núcleo celular de glóbulos brancos, encontrou um composto de natureza ácida, desconhecido até então, rico em fósforo e nitrogênio e resistente à ação de pepsina. Este composto que aparentava ser constituído por grandes moléculas foi então denominado por ele de nucleína (Miescher, 1869). Mais tarde, em 1889, Altmann, que era aluno de Miesher, purificou a nucleína e comprovou sua natureza ácida, bem como a presença de proteína nestas moléculas, chamando estas moléculas, então, de “ácidos nucleicos” (Altmann, 1889). No entanto, somente alguns anos depois, no final do século XIX, é que se passou a aceitar o núcleo como um sítio físico onde se encontra o material genético, fato confirmado definitivamente em 1924 (Feulgen, 1924). Em 1920 foi descoberto então a unidade fundamental do ácido desoxirribonucleico (DNA) bem como suas propriedades, chamados desde então de nucleotídeos (Levene, 1920).

Muitos foram os postulados que serviram de base para que Watson e Crick elucidassem a estrutura tridimensional do DNA em 1953 (Watson e Crick, 1953), como algumas evidências químicas, em particular aquelas propostas por Chargaff em 1950, quando publicou as

proporções de bases do DNA (Chargaff, 1950), e as imagens de difração de raio-x de Wilkins e Randall (Wilkins e Randall, 1952).

A elucidação da estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico por Watson e Crick é considerada por muitos como a maior descoberta científica do século, não só pelo grande impacto que a caracterização estrutural de uma molécula tão importante trouxe para a comunidade científica, mas também pelo fato de que esta descoberta impulsionou diversos estudos subsequentes que buscaram entender mais a fundo a função destas moléculas nos sistemas biológicos (Patra, 2007).

## 1.2 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

O DNA é uma macromolécula pertencente aos ácidos nucleicos, classificação molecular na qual se encontram também os ácidos ribonucleicos (RNA). O DNA possui um papel fundamental na manutenção, adaptação e perpetuação da vida (Blackburn, 2006). As funções biológicas executadas por esta molécula desempenham um papel central na capacidade de sobrevivência de organismos vivos, além de serem um dos pré-requisitos para que a própria vida ocorra. Isso se dá porque estas moléculas contêm as informações necessárias para a síntese das biomoléculas que controlam os sistemas vivos, como as proteínas e outros ácidos nucleicos como o RNA, por exemplo (Nelson e Cox, 2014). De um modo geral o DNA consiste em um longo polímero linear constituído de monômeros chamados nucleotídeos (Figura 1). Watson e Crick puderam demonstrar que o DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas enoveladas em torno de um eixo, formando uma dupla-hélice. O pareamento antiparalelo perfeito das duas cadeias cria duas

cavidades denominadas sulco maior e sulco menor (Watson e Crick, 1953).

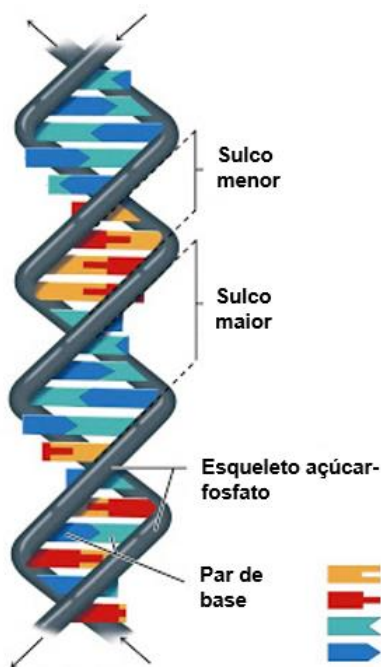


Figura 1. Estrutura tridimensional do DNA mostrando a interação entre os nucleotídeos, o esqueleto açúcar-fosfato e os sulcos maiores e menores da molécula. Adaptado de (Horton, 2006).

A sequência dada pela combinação dos nucleotídeos confere ao DNA a capacidade de armazenar e transmitir informação. Os nucleotídeos apresentam três componentes característicos: uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato (Figura 2 à esquerda). A molécula sem o grupo fosfato é denominada nucleosídeo. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos relacionados chamados pirimidina e purina. Tanto DNA quanto RNA contêm duas bases púricas principais, adenina (A) e guanina (G), bem como duas pirimidinas, ambas possuindo citosina (C)

e outra base exclusiva, timina (T) para DNA e uracila (U) para RNA (Figura 2 à direita) (Alberts B, 2002; Blackburn, 2006; Nelson e Cox, 2011; 2014).

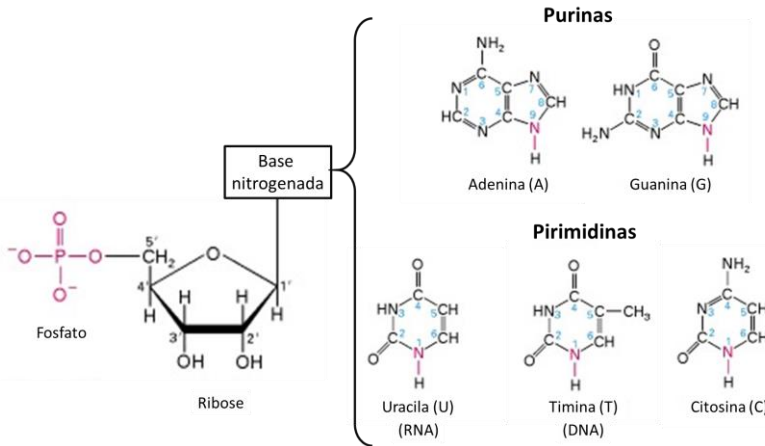


Figura 2. À esquerda estrutura geral de um nucleotídeo; à direita estrutura das diferentes bases nitrogenadas do DNA e RNA. Adaptado de (Lodish H, 2000).

Os nucleotídeos são ligados covalentemente por “pontes” de grupos fosfato, nas quais o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3'-hidroxil do próximo nucleotídeo, criando uma ligação fosfodiéster (Figura 3). Portanto, a espinha dorsal covalente dos ácidos nucleicos consiste em fosfatos e resíduos de pentose alternados, sendo que as bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais ligados em intervalos regulares. O esqueleto de ambos DNA e RNA são hidrofílicos, os grupos hidroxil dos resíduos de açúcar formam ligações de hidrogênio com a água. Os grupos fosfato, com um pKa próximo a 0, são completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7,0 (Nelson e Cox, 2014).



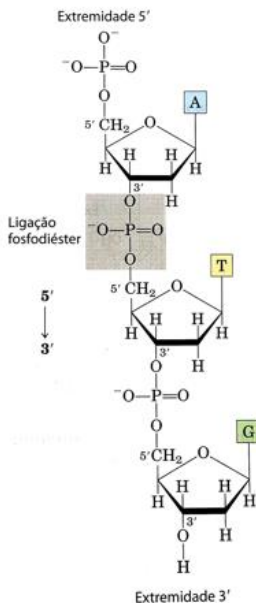


Figura 3. Modelo de ligação fosfodiéster (Nelson e Cox, 2014).

O DNA é particularmente resistente à hidrólise espontânea. Estima-se que os tempos de meia-vida variam desde centenas de milhares até centenas de milhões de anos para a clivagem de uma única ligação fosfodiéster à 25 °C e pH 7,2. Tal inércia hidrolítica, que garante a conservação da informação genética, torna bastante difícil sua manipulação, como por exemplo sua expressão, duplicação, reparação de danos e eliminação de DNA estranho. *In vivo*, estes problemas são resolvidos por uma grande diversidade de enzimas que interagem com o DNA, incluindo enzimas hidrolíticas (nucleases e topoisomerasas), que catalisam eficientemente o corte do DNA, acelerando a reação em  $10^{12}$  a  $10^{16}$  vezes em relação à hidrólise espontânea (Sigman *et al.*, 1993; Krämer, 1999; Mancin *et al.*, 2005; Nelson e Cox, 2011; 2014).

### 1.3 A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DNA

O DNA apresenta algumas peculiaridades quanto às suas formas tridimensionais. A forma tridimensional mais comumente encontrada em sistemas biológicos é a forma B do DNA (B-DNA), esta estrutura é favorecida em ambiente hidratado e com baixa salinidade (Figura 4). O B-DNA foi aquele proposto por Watson e Crick e corresponde a estrutura mais estável do DNA em condições fisiológicas, portanto o mais utilizado como referência para estudos que envolvam propriedades estruturais destes ácidos nucleicos (Nelson e Cox, 2014; Pages *et al.*, 2015).

Existem ainda outras variantes estruturais que tiveram suas estruturas cristalográficas bem caracterizadas, que são as formas A e Z do DNA (Figura 4). A estrutura do A-DNA é favorecida em muitas soluções que são relativamente livres de água. Este DNA ainda é organizado na forma de dupla-hélice à direita, porém as hélices são mais largas, com maior número de pares de bases por cada volta. Além disso, os pares de bases no A-DNA não estão perfeitamente perpendiculares ao eixo da hélice. Estas mudanças estruturais aprofundam o sulco maior do DNA, ao mesmo tempo tornando o sulco menor mais superficial. A forma Z do DNA é um afastamento mais radical da estrutura do B-DNA, a diferença mais marcante sendo a rotação helicoidal à esquerda. Esta estrutura apresenta ainda mais pares de bases por volta helicoidal, fornecendo uma característica mais delgada à molécula. O sulco maior nesta forma de DNA é pouco visível, enquanto o sulco menor é estreito e profundo. A ocorrência do A-DNA em células é duvidosa, mas existem evidências para algumas pequenas extensões do Z-DNA em bactérias e em eucariotos. Os trechos de Z-DNA podem ter um papel na regulação da

expressão de alguns genes ou em recombinação genética (Blackburn, 2006; Nelson e Cox, 2011; 2014; Pages *et al.*, 2015).



Figura 4. Comparação das formas A, B e Z do DNA (Nelson e Cox, 2014).

#### 1.4 DNA PLASMIDIAL

Os seres procariotos apresentam alguns aspectos estruturais característicos quanto ao tamanho e distribuição de sua estrutura celular, possuindo uma organização compactada. Isto afeta muitas de suas macromoléculas, entre estas seu DNA, incluindo seu material genético extracromossomal denominado plasmídeo. O plasmídeo é uma pequena cadeia de DNA de dupla-hélice cujas extremidades terminais são ligadas

entre si, apresentando-se como um DNA circular, bem diferente dos cromossomos mitóticos de eucariotos que usualmente são lineares e com extremidades terminais livres (Blackburn, 2006; Nelson e Cox, 2014).

A circularização do DNA plasmidial confere uma outra propriedade estrutural específica chamada super-helicidade (Figura 5). Isto acontece quando o DNA espiralado em forma de dupla-hélice sofre uma nova torção em volta de um eixo, e o enrolamento deste eixo sobre si mesmo gera este DNA supertorcido, também chamado de superenovelado (Del Solar, 1998). No meio intracelular o superenovelamento é proporcionado por enzimas específicas (DNA girases e topoisomerases) (Gellert, 1976). Muitas moléculas de DNA permanecem altamente superenoveladas mesmo depois de serem extraídas e purificadas, indicando que parte deste superenovelamento é resultado de características intrínsecas da estrutura do DNA (Nelson e Cox, 2014). Por causa desta torção, o DNA superenovelado apresenta uma alta tensão, e perturbações físicas ou químicas podem ocasionar o relaxamento e, portanto, o retorno da estrutura para forma circular (aberta) original (Witz, 2010).

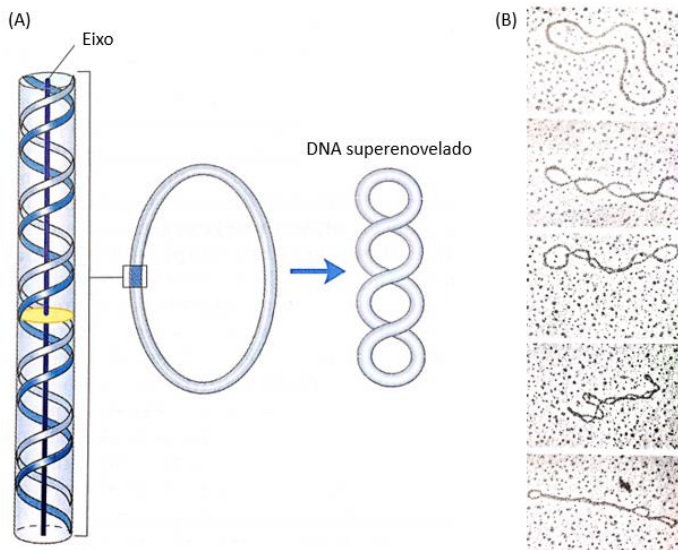


Figura 5. DNA plasmidial. (A) Esquema que mostra a estrutura do DNA superenovelado. (B) Micrografia eletrônica mostrando moléculas de DNA relaxados (FII) e superenovelados (FI). O grau de enovelamento aumenta de cima para baixo. Adaptado de (Nelson e Cox, 2014).

Em muitos casos, os plasmídeos não conferem uma vantagem óbvia a seus hospedeiros e sua única função parece ser a autopropagação. Entretanto, alguns plasmídeos carregam genes que são úteis para a bactéria hospedeira, como os que as tornam resistentes a agentes antibacterianos. Este DNA pode ser facilmente extraído intacto das bactérias e modificado geneticamente, o que o torna uma ferramenta amplamente utilizada em processos biotecnológicos (Blackburn, 2006). De um modo geral, é possível realizar inserções de genes endógenos em plasmídeos, e estes podem ser levados a diferentes organismos que passam a expressar estes genes de interesse. Para isso faz-se necessário o uso de diversas ferramentas de biologia molecular, principalmente aquelas que fornecem a cisão, clivagem, da estrutura do DNA plasmidial

em sequências específicas, tornando possível a inserção de um novo gene. Estas ferramentas de clivagem são moléculas proteicas, mais especificamente enzimas chamadas nucleases, que possuem a função de clivar ácidos nucleicos. Estas enzimas possuem especificidade para um pequeno espectro de sequência de pares de bases, além de possuírem uma alta fidelidade à sua sequência alvo, o que dificulta a ação destas em outras moléculas de DNA com sequências distintas (Weber *et al.*, 2014).

### 1.5 INTERAÇÃO DE PEQUENAS MOLÉCULAS COM O DNA

A maioria dos processos biológicos são dependentes de reconhecimento molecular e interações reversíveis de um conjunto de moléculas com outras. Quando se trata de interação entre drogas e ácidos nucleicos, a meta desejável é que a maquinaria no processo de replicação ou expressão do gene possa ser modulada através de drogas que se ligam às estruturas específicas. Tais compostos teriam um papel direto e benéfico no tratamento de várias doenças resultantes de alterações nos processos que envolvem os ácidos nucleicos, como o câncer. Além disto, ocorre um grande uso dos ácidos nucleicos em pesquisas na área de biotecnologia e biologia molecular, que procuram encontrar ferramentas que facilitem a manipulação do material genético (Patra, 2007; Wijshake *et al.*, 2014).

As interações entre pequenas e/ou macromoléculas ao DNA se dão por meio de forças intermoleculares clássicas (ligação covalente, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, ligações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras), associadas a uma região ou macroestrutura da hélice do DNA (bases nitrogenadas, sulco maior ou menor, eixo da hélice ou esqueleto de fosfato-carbono, por exemplo).

Existem três maneiras principais em que ligantes de baixo peso molecular podem interagir com a dupla cadeia de DNA (Figura 6): **Interações eletrostáticas**, que envolve a ligação da molécula no exterior da hélice por meio de interações não específicas, principalmente com o esqueleto de açúcar-fosfato; **intercalação**, onde um sistema de um anel aromático planar se insere entre dois pares de bases adjacentes, perpendiculares ao eixo helicoidal.; e **ligação pelos sulcos**, onde o ligante faz contato direto com grupos funcionais sobre as bordas das bases que se projetam em ambos os sulcos maior ou menor (Blackburn, 2006). Os compostos que têm o potencial para ser clinicamente úteis normalmente são intercalantes ou ligantes de sulcos.

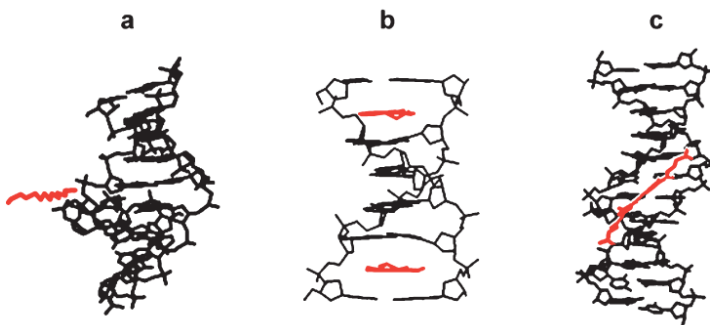


Figura 6. Representações esquemáticas dos três modos principais de interação de moléculas com o DNA. O ligante é mostrado em vermelho e as cadeias de DNA em preto: (a) Interação eletrostática. (b) intercalação. (c) Ligação pelos sulcos (Blackburn, 2006).

## 1.6 NUCLEASES

Os estudos referentes a complexos metálicos que possuem a capacidade de interagir e clivar ácidos nucleicos tiveram início na década de 70, quando Sigman e colaboradores buscavam elucidar o mecanismo de catálise de uma das principais enzimas da maquinaria metabólica dos

ácidos nucleicos, a DNA-polimerase (Sigman *et al.*, 1979). Os estudos acerca da enzima começaram na década de 1950, quando esta foi pela primeira vez purificada e teve sua estrutura caracterizada (Bessman Mj, 1956). Muitas foram as especulações posteriores sobre o mecanismo de funcionamento da DNA-polimerase. No final da década de 70, o grupo de Sigman procurou elucidar este mecanismo, buscando confirmar se a atividade da DNA-polimerase de *Escherichia coli* era dependente do íon Zinco (Sigman *et al.*, 1979). Essa hipótese havia sido reportada por trabalhos anteriores que mostravam a inibição da atividade desta enzima na presença de um quelante de metais de transição, o 1,10-fenantrolina (D'aurora, 1977a; b). O objetivo de Sigman no fim da década de 70 era comprovar que o quelante de metal 1,10-fenantrolina era capaz de interagir com o sítio ativo da DNA-polimerase, que supostamente continha o íon Zinco, e deste modo diminuir sua atividade. No entanto, um resultado inesperado foi encontrado neste trabalho: a DNA-polimerase realmente diminuiu sua atividade na presença do quelante, porém a quantidade de seu substrato (DNA) também estava diminuindo, sendo esta então a consequência da diminuição da atividade enzimática. Com base em algumas características da reação experimental o grupo de pesquisa constatou que havia nas reações traços do íon Cobre, e que este também era quelado pela molécula 1,10-fenantrolina, dando origem ao primeiro complexo sintético com capacidade de clivar moléculas de DNA: O Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) (Figura7A) (Sigman *et al.*, 1979).



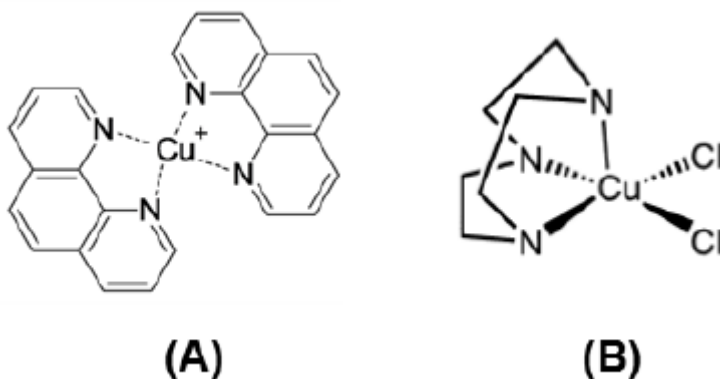


Figura 7. Representação da estrutura dos complexos Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) (A) e Cu(II)-([9]aneN3)Cl<sub>2</sub> (B). Hegg e Burstyn (1998) Sigman (1979).

Depois de formado, o complexo Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) era capaz de clivar as moléculas de DNA, diminuindo a disponibilidade de substrato para a atividade da DNA-polimerase, alterando, assim, sua atividade. Este complexo cliva o DNA através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são capazes de oxidar tanto a desoxirribose quanto a base nitrogenada (Figura 8) (Sigman *et al.*, 1979). A descoberta deste complexo metálico levou a criação de uma nova área de pesquisa que vem sofrendo um grande crescimento desde então: o estudo da interação de pequenas moléculas, principalmente complexos metálicos, com DNA (Graham, 1980).

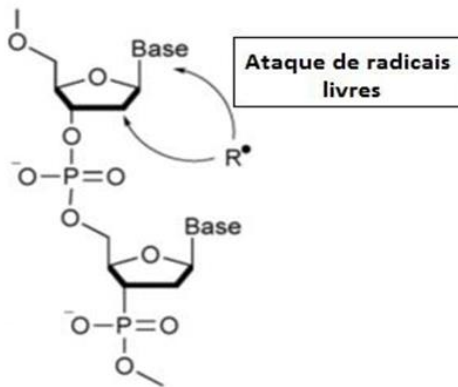


Figura 8. Esquema proposto para o mecanismo oxidativo de clivagem do DNA. Adaptado de Sigman et al., 1979.

O crescimento desta nova área de pesquisa levou à elucidação de um outro mecanismo possível de clivagem de DNA através de complexos metálicos, quando Hegg e Burstyn (1996) relataram a clivagem de DNA pelo complexo  $\text{Cu(II)-}([9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$  (Figura 7B) na ausência de oxigênio. Diferente do complexo  $\text{Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina)}$  que só apresentava atividade em aerobiose, sugeriu-se um possível mecanismo hidrolítico para a atividade do complexo  $\text{Cu(II)-}([9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ , o qual foi capaz de hidrolisar ésteres de fosfato com alta eficiência, característica semelhante as enzimas nucleases (Hegg, 1995; Deal, 1996).

Sabe-se hoje que muitas das enzimas naturais, principalmente as nucleases, possuem centros metálicos em seu sítio ativo, chamadas de metaloenzimas, sendo que estes íons estão envolvidos no enovelamento da estrutura tridimensional das enzimas e são responsáveis pela manutenção dos estados de transição (Rangarajan e Shankar, 2001; Wong-Deyrup *et al.*, 2012). A presença dos metais em seu sítio ativo também está relacionada com o aumento de afinidade da enzima pelo

substrato e ao favorecimento cinético da reação (Dupureur, 2008; Xie *et al.*, 2008; Newie *et al.*, 2016). O mecanismo mais aceito para hidrólise do DNA catalisado pelas nucleases ocorre pelo ataque nucleofílico do oxigênio da água para formar um fosfato intermediário penta-coordenado. Em seguida, a clivagem de P-O3' ou P-O5' fornece a quebra da fita, liberando os terminais R-OH e R-O-PO<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>) que podem ser religados enzimaticamente (Figura 9) (Liu *et al.*, 2004; Mancin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2016). As nucleases são seletivas, uma vez que atuam em sequências específicas e conservadas no DNA e estão presentes em processos de reparação, degradação, recombinação e modificação da estrutura de ácidos nucleicos (Nelson e Cox, 2014).

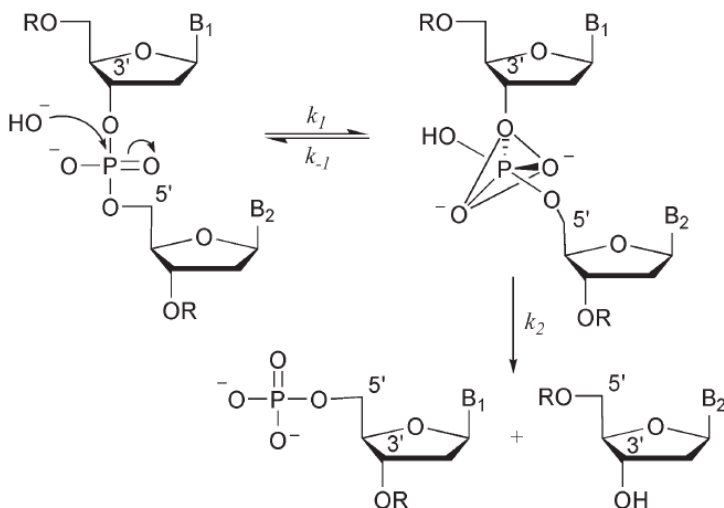


Figura 9. Mecanismo de clivagem hidrolítica de DNA, mostrando o ataque nucleofílico resultando na quebra das fitas e liberando os terminais R-OH e R-O-PO<sub>3</sub> (Mancin *et al.*, 2005).

Deste modo, muito esforço tem sido colocado em pesquisas dirigidas para o desenvolvimento de metalonucleases artificiais, ou seja,

agentes sintéticos que contenham um íon metal em seu sítio ativo, sendo estes principalmente  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , que demonstram ser eficientes para clivagem da ligação fosfodiéster (Sigman e Chen, 1990; Sigman *et al.*, 1993; Hegg e Burstyn, 1995; Krämer, 1999; Sreedhara *et al.*, 2000; Cowan, 2001; Liu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Cowan, 2008; Liu e Wang, 2009; Souza, 2010; Souza *et al.*, 2013; Zastrow e Pecoraro, 2014; Camargo *et al.*, 2015; Chennam *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2016).

## 1.7 FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS

Dentre as metalonucleases artificiais que são conhecidas por apresentarem capacidade de interagir e clivar o DNA, os biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) apresentam grande relevância. O sítio ativo desta metaloenzima se constitui de um centro binuclear de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ , sendo  $\text{M}^{\text{II}}$  um íon divalente de Fe, Zn ou Mn, dependendo do organismo vivo ao qual a enzima pertence (Mitić *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2015). As fosfatases ácidas púrpuras vêm sendo isoladas a partir de vários organismos, como do fluído de útero suíno (Chen *et al.*, 1973), baço bovino (Campbell e Zerner, 1973), feijão vermelho (Beck *et al.*, 1986), batata doce (Hefler e Averill, 1987), soja (Lebansky *et al.*, 1992), arroz (Zhang *et al.*, 2011), ratos (Anderson e Toverud, 1986) e seres humanos (Lin *et al.*, 1983). A função biológica destas metaloenzimas ainda não é bem compreendida, no entanto, alguns estudos as têm associado a diversas funções tanto em plantas quanto em mamíferos, sendo sugerido neste último a participação na manutenção da renovação óssea, designando esta enzima como um potencial alvo de fármacos para o tratamento de osteoporose (Mitić *et al.*, 2006). Seu mecanismo catalítico

ainda é propósito de muitos estudos, e seu grande tamanho e complexidade dificulta o entendimento do processo de catálise, o que inspira o desenvolvimento de moléculas mais simples que mimetizem o seu centro ativo (Figura 10). São esses os chamados complexos biomiméticos, desenvolvidos para mimetizar propriedades estruturais e funcionais das enzimas originais (Zhao *et al.*, 2013; Jana *et al.*, 2016). Com isso há uma diminuição da complexidade do sistema o que facilita a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de catálise. Em 2007, Ademir Neves e colaboradores conduziu o desenvolvimento do primeiro modelo biomimético das PAPs do feijão-vermelho cujo sítio ativo constitui-se de um centro metálico de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  (Neves *et al.*, 2007). Em estudos posteriores este complexo modelo mostrou-se não apenas semelhante à enzima mimetizada em aspectos estruturais e físico-químicos, mas também funcionais, sendo ativo na hidrólise de ésteres de fosfato ativados e ligações fosfodiéster (Peralta *et al.*, 2010).

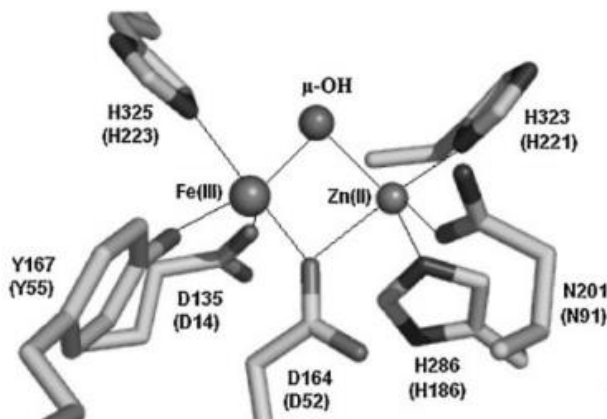


Figura 10. Representação do sítio ativo da fosfatase ácida púrpura de feijão vermelho, mostrando os resíduos de aminoácidos que coordenam com os metais (Schenk *et al.*, 2013).

## 1.8 ESFERAS DE COORDENAÇÃO

Desde o desenvolvimento da primeira metalonuclease artificial na década de 70 (Sigman *et al.*, 1979) busca-se cada vez mais o aprimoramento destas moléculas, visando o incremento da atividade catalítica, o aumento de sua seletividade ao DNA e a aproximação estrutural do sítio catalítico à nucleases biológicas. Sabe-se que para o alto desempenho catalítico de uma enzima faz-se necessária a estabilização de uma estrutura tridimensional a qual dará uma conformação característica à proteína. No contexto estrutural destas moléculas, a palavra estabilização expressa a tendência de uma proteína manter sua conformação nativa. Esta conformação é estabilizada principalmente pelas cadeias laterais dos aminoácidos dispostos na estrutura tridimensional da molécula que interagem entre si e entre o meio, através principalmente de interações fracas (Ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, e iônica), além de interações covalentes (como as ligações dissulfeto) (Lindström e Pettersson, 2003; Nelson e Cox, 2014).

Deste modo, até mesmo os aminoácidos mais distantes do sítio ativo são responsáveis pela manutenção da atividade catalítica. Estes estão envolvidos na manutenção da estabilidade proteica, além de, em muitos casos, mesmo não estando presentes no sítio ativo, serem cruciais para a interação da enzima com substrato, ou para a estabilização do complexo Enzima-Substrato (Shook e Borovik, 2010; Nelson e Cox, 2014).

Na grande maioria dos biomiméticos de metalonucleases a modelagem é realizada de modo a mimetizar os resíduos de aminoácidos que coordenam com o metal e o mantém estável em seu sítio ativo, a

chamada primeira esfera de coordenação. Esta primeira esfera de coordenação consiste em um metal com uma série de ligantes que o estabilizam (Hartwig, 2010), estes ligantes podem ser modulados de modo a alterar a reatividade da reação de catálise. Uma área de estudo recente busca mimetizar também a segunda esfera de coordenação de complexos metálicos, adicionando a estes complexos ligantes mais distantes do centro metálico e que não estão envolvidos diretamente na estabilização do metal. Esta modificação tem como objetivo integrar outras forças (principalmente não-covalentes), que estão associadas ao aumento da interação entre o catalisador e o substrato e a estabilidade do complexo formado por estes (Figura 11) (Funhoff *et al.*, 2005; Shook e Borovik, 2010; Shaw *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Guo e Marti-Rujas, 2016).

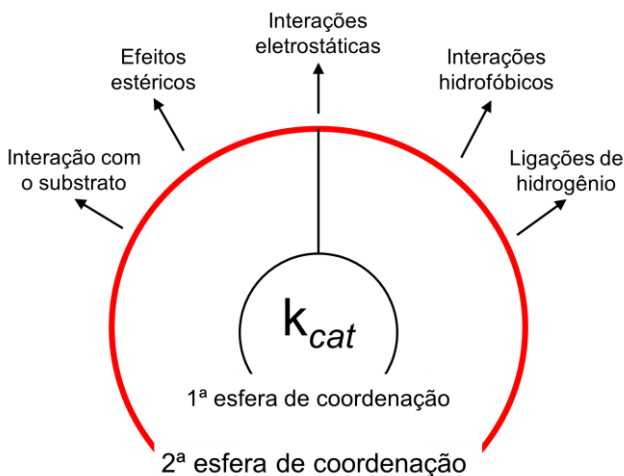


Figura 11. Esquema representando as esferas de coordenação de um complexo metálico e as forças envolvidas em cada uma das esferas. Adaptado de (Lewis, 2013)

Um sistema enzimático que apresenta uma influência da segunda esfera de coordenação no processo de catálise é a enzima “*staphylococcal nuclease*”, responsável por catalisar a hidrólise de DNA e RNA aumentando a velocidade da reação em cerca de  $10^{16}$  vezes. O mecanismo catalítico desta enzima consiste em uma reação ácido base envolvendo os resíduos aminoácidos Arg35, Glu43 e Arg87. A entrada do substrato no sítio ativo da enzima é facilitada através da interação do grupo guanidínio do resíduo de aminoácido Arg35 com o diéster de fosfato através de ligações de hidrogênio. O nucleófilo é gerado pelo grupo carboxilato do Glu43, e por fim, a Arg87 estabiliza o estado de transição e promove a liberação do grupo de saída ao final da reação (Figura 12). Estes fatores combinados são responsáveis pelo aumento da velocidade da reação de hidrólise de ácidos nucleicos reduzindo a energia de ativação necessária para que a clivagem ocorra (Cotton *et al.*, 1979; Zhao *et al.*, 2013).

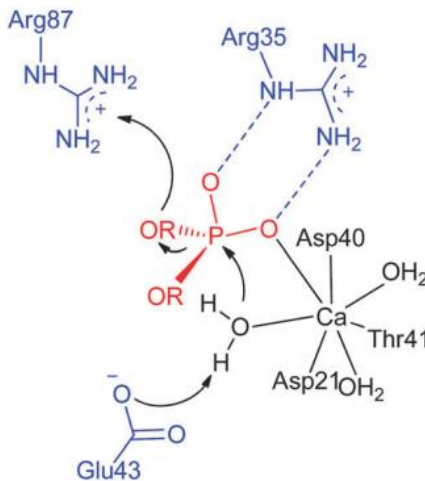


Figura 12. Ilustração do sítio ativo da metaloenzima *staphylococcal nuclease*. O cofator, a segunda esfera de coordenação e o substrato estão marcados em preto, azul e vermelho respectivamente (Zhao *et al.*, 2013).



As fosfatases ácidas púrpuras também correspondem a um modelo enzimático onde há a participação de resíduos de aminoácidos localizados fora do sítio ativo no processo de catálise. Estudos desmonstraram que o resíduo His92 desmoeinha um papel importante na hidrólise de ésteres de fosfato, mesmo este não fazendo parte do sítio ativo. Ao substituir este aminoácido por um resíduo de alanina, observou-se uma diminuição de 10 vezes na atividade catalítica, ressaltando a importância deste resíduo na interação entre enzima e substrato (Funhoff *et al.*, 2005).

## 1.9 APLICAÇÕES

Os complexos metálicos que interagem e/ou clivam o DNA podem ser utilizados como ferramentas em várias metodologias: desenvolvimento de DNA recombinante, modelagem de enzimas de restrição, aplicações terapêuticas, sequenciamento de DNA, mapeamento genético e *footprinting* (Bashkin, 1999; Krämer, 1999; Chakravarty, 2006).

A técnica de *footprinting* pode ser aprimorada pelo uso de complexos metálicos que produzem fragmentos de clivagem muito menores e menos específicos que os gerados pela enzima DNase I utilizada tradicionalmente, e que promove um padrão de DNA clivado de melhor resolução (Armitage, 1998). A enzima DNase I apresenta uma preferência em hidrolisar a ligação fosfodiéster adjacente à uma pirimidina (C ou T). Portanto, esta enzima pode oferecer alguma especificidade por sítio, o que nem sempre é o ideal para a técnica (Jeff, 2016). Outros complexos são utilizados na técnica de DNA *footprinting*, como o Fe-EDTA, um pequeno complexo que cliva o DNA de modo inespecífico através da geração de espécies reativas de oxigênio (Tullius,

2005). Embora seja muito eficiente para a fragmentação de sequências curtas de DNA, o complexo Fe-EDTA leva muito tempo para a fragmentação de grandes sequências, inviabilizando seu uso com este tipo de molécula (Jain e Tullius, 2008; Jeff, 2016).

Além disso, complexos metálicos sintéticos possuem uma maior estabilidade e uma síntese mais barata que uma enzima recombinante. As enzimas estão mais suscetíveis a eventuais problemas enfrentados durante os procedimentos experimentais, como perda de atividade durante ciclos de congelamento/descongelamento, alterações estruturais em consequência de oscilações de pequenas faixas de pH e temperatura, e adsorção em recipientes plásticos (Rebilly *et al.*, 2015).

Complexos metálicos que apresentam mecanismo oxidativo podem ser utilizados para investigar o processo de reparação do DNA quando este é danificado por EROS (Kimura e Sakaguchi, 2006; Schlacher *et al.*, 2006), assim como os que apresentam atividade antimicrobiana podem ser aprimorados para utilização como fármacos (Efthimiadou *et al.*, 2007; Patil *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2011). Complexos metálicos com capacidade de interação com o DNA, porém sem atividade de clivagem, podem ser utilizados como sondas conformacionais (Zeglis *et al.*, 2007).

O DNA possui um papel central no controle do metabolismo fisiológico, e sua função está ligada diretamente a manutenção celular. Dentro deste contexto busca-se, cada vez mais, moléculas que tenham a capacidade de interagir com o DNA e controlar o modo como esta desempenha sua função, principalmente no que diz respeito as mutações que levam à alterações de funções biológicas. A cisplatina, um fármaco que possui a capacidade de interagir com o DNA, é um exemplo de

complexo metálico que tem uma afinidade por uma região específica do DNA, interagindo com o N7 da base nitrogenada Guanina e bloqueando os processos de transcrição e replicação, levando a morte celular (Reedijk, 1985). Os principais alvos desta molécula são as células tumorais, pelo fato de estarem em constante divisão estas se tornam mais suscetíveis à ação desta droga.

Além deste, é possível encontrar outros complexos metálicos na literatura que também desempenham a função de clivar DNA com possíveis aplicações em tratamentos antitumorais (González-Álvarez *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Shahabadi, 2014; Srishailam *et al.*, 2014; Wang, L. *et al.*, 2014; Wang, Q. *et al.*, 2014; Ragheb *et al.*, 2015).

Deste modo, a busca por novos complexos metálicos que possuam a capacidade de interagir e clivar o DNA com grande eficiência, pode auxiliar estudos de elucidações estruturais de sítio ativo de enzimas, bem como mecanismos de catálise enzimática, além do desenvolvimento de moléculas que possam ser utilizadas como estratégias metodológicas de biologia molecular e na indústria farmacêutica.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar a interação e clivagem de DNA por diferentes complexos binucleares de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras com alterações em sua segunda esfera de coordenação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade dos complexos de clivarem DNA plasmidial em diferentes concentrações, tempos e temperaturas de incubação;
- Analisar o efeito do pH na clivagem de DNA plasmidial pelos complexos;
- Analisar o modo de interação dos complexos ao DNA através de ensaios de força iônica, ligantes de sulco e interação com CT-DNA através de espectroscopia de dicroísmo circular (CD);
- Analisar o mecanismo de clivagem dos complexos através da adição de sequestradores de radicais livres às reações, bem como através de ensaios de clivagem na ausência de oxigênio em atmosfera de argônio;
- Determinar os parâmetros cinéticos dos complexos através da clivagem de DNA plasmidial;
- Analisar a clivagem e interação sítio-específica dos complexos em estudo com oligonucleotídeos de sequência conhecida

através de clivagem direta em gel de poliacrilamida de alta resolução e da técnica *footprinting*;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados nos ensaios com DNA possuíam grau de biologia molecular e suas soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q (resistividade a 25°C de no máximo 18,2 MΩ cm, com Teor de Carbono Orgânico Total < 10 ppb) obtida pelo sistema Milli-Q Sinergy (Millipore, USA). Nos casos onde havia necessidade do uso de solventes orgânicos, como etanol e acetonitrila, os reagentes utilizados possuíam grau analítico para espectroscopia UV-Vis. Todas as soluções foram previamente esterilizadas, utilizando-se filtros de membrana tipo Millex de 0,22μm (Millipore, USA) para evitar a contaminação bacteriana.

#### 3.2 COMPLEXOS EM ESTUDO

Os cinco complexos utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo Dr. Tiago Pacheco de Camargo (Química) e pela doutoranda Renata da Silva sob orientação do Prof. Dr. Ademir Neves, do Departamento de Química (QMC/CFM), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As moléculas correspondem à uma série de complexos binucleares de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ , os quais foram adaptados de um complexo original já estudado por nosso grupo de pesquisa (Peralta *et al.*, 2010), com centro metálico Fe e Zn.

Estes complexos são biomiméticos da metaloenzima fosfatase ácida púrpura, a qual contém em seu sítio ativo um centro binuclear de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ , sendo  $\text{M}^{\text{II}}$  um íon de Fe, Zn ou Mn, dependendo do organismo

vivo ao qual a enzima pertence (Mitić *et al.*, 2006). Nos complexos em estudo foram adicionadas cadeias carbônicas com diferentes números de átomos de carbono contendo diamina, com o objetivo de mimetizar a segunda esfera de coordenação nestes complexos, de modo a criar uma maior interação eletrostática entre o complexo e o DNA, resultado da diferença de cargas assumida por estes em solução e pH específico. Na Figura 13 é possível visualizar os 5 complexos que foram utilizados neste trabalho para verificar os efeitos da segunda esfera de coordenação, sendo o complexo controle aquele que possui um grupo aldeído na posição orto em relação ao fenol terminal (FeZn-L0) mostrado em (A). Realizaram-se modificações nesse grupo aldeído, do lado duro, por inserção de diaminas alifáticas como cadeias laterais, sendo elas: 1,2-diaminoetano (FeZn-L2) em (B), 1,4-diaminobutano (FeZn-L4) em (C) e 1,6-diaminohexano (FeZn-L6) em (D). Além destes complexos com o centro metálico Fe e Zn, em uma outra abordagem, foi substituído o íon  $Zn^{II}$  por  $Cu^{II}$  no complexo que possui 1,6-diaminohexano como cadeia lateral com a intenção de avaliar um outro possível mecanismo de catálise proporcionado pela alteração deste segundo metal, sendo este o quinto complexo utilizado neste trabalho (FeCu-Lc) mostrado em (E).



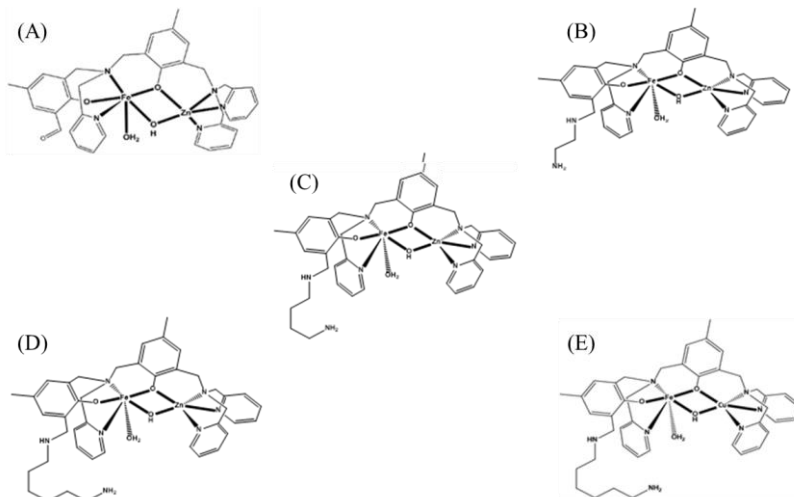


Figura 13. Representação estrutural dos complexos FeZn-L0 (A), FeZn-L2 (B), FeZn-L4 (C), FeZn-L6 (D) e FeCu-Lc (E).

### 3.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Foi utilizado para os ensaios de clivagem o plasmídeo pBSK-II (Stratagene, USA) dupla-fita e superenovelado, com 2961 pb. O DNA plasmidial superenovelado (FI) geralmente é uma manifestação de tensão estrutural, sendo que, ao ocorrer a quebra em apenas uma das fitas, esta molécula irá sofrer um relaxamento estrutural, adquirindo uma forma circular aberta (FII). Se um segundo corte acontecer na fita oposta e próximo ao primeiro, com um limite de aproximadamente 12 pares de bases de distância entre os cortes, este DNA irá assumir uma forma linear (FIII) (Figura 14). Estas três formas do DNA possuem diferenças estruturais que conferem mobilidades eletroforéticas distintas entre as mesmas, sendo que esta distinção de mobilidade ( $F I > F III > F II$ ) torna possível a completa separação e posterior quantificação das formas do DNA plasmidial (Oliveira, 2006).

Este plasmídeo foi amplificado a partir da transformação em células competentes, neste caso a bactéria *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , seguindo protocolo preconizado por Ausubel e colaboradores (1995) e detalhadamente descrito por Oliveira (2006). Após a multiplicação, as culturas bacterianas foram centrifugadas e o DNA extraído e purificado seguindo o protocolo do kit de extração e purificação de DNA plasmidial *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). A concentração do DNA plasmidial extraído foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis ( $A_{260} = 1,0 = 50\mu\text{g mL}^{-1}$  de DNA) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose (Ausubel, 1999; Oliveira, 2006).

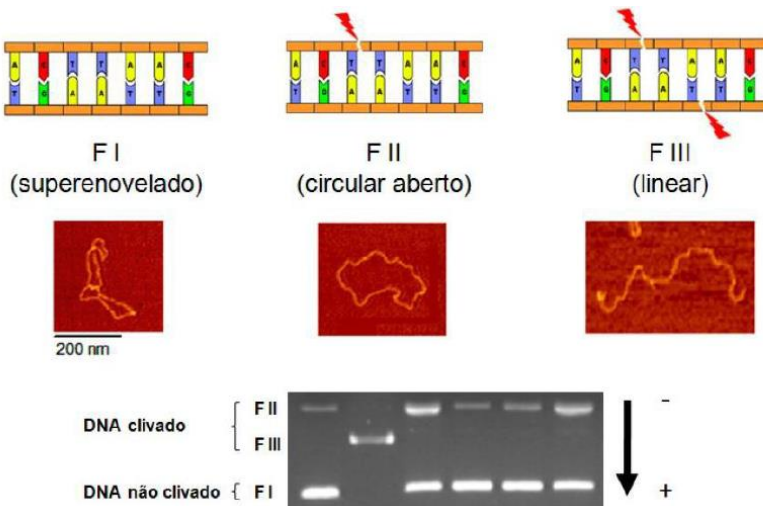


Figura 14. Ilustração das três formas do DNA plasmidial e sua separação em gel de agarose, mostrando as diferenças estruturais e de mobilidade eletroforética (Bortolotto, 2015).

### 3.4 CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

#### 3.4.1 Procedimento geral

O procedimento geral de análise da clivagem plasmidial aplicado aos complexos de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  consistiram em uma reação típica de clivagem, contendo 330ng de DNA pBSK-II em um volume de 20 $\mu\text{L}$ , que foram tamponados com tampão adequado e tratados com 5 $\mu\text{L}$  de complexos solubilizados em acetonitrila 100% (em diferentes concentrações). O tempo de reação inicial foi de 8h a 50°C. Durante a reação as amostras foram mantidas ao abrigo da luz. Para finalizar as reações de clivagem foram adicionados 5 $\mu\text{L}$  de tampão de corrida 6x concentrado (EDTA 0,25M em pH 8,0, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%). Em seguida as amostras foram mantidas em geladeira (4°C) até serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 100min a 90V em tampão TBE 0,5X (Tris 44,5mM, ácido bórico 44,5mM, EDTA 1mM em pH 8,0). Os géis foram então fotografados utilizando o sistema de fotodocumentação DigiDoc-It (UVP, USA) e as frações de cada forma do DNA plasmidial foram quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK *Molecular Imaging Software 5.0* (Carestream Health, USA). Uma vez que o brometo de etídio possui uma maior dificuldade de intercalar-se com a forma superenovelada do DNA plasmidial, há uma menor emissão de fluorescência por esta forma de DNA em relação às demais. Para corrigir a real quantidade de DNA superenovelado da amostra, o valor encontrado foi multiplicado por 1,47 e corrigido por proporcionalidade os valores obtidos para as demais formas (Jin *et al.*, 2007). A quantidade de DNA clivado (%) foi considerada como a soma das frações de DNA na forma circular aberta (F II) e linear (F III), enquanto a fração ou quantidade de

DNA intacto (%) foi considerada como a fração de DNA na forma superenovelada.

Os dados apresentados referente aos ensaios de clivagem correspondem a média do resultado de três experimentos independentes, como um modo de avaliar possíveis variações experimentais, enquanto o substrato (DNA) e os complexos não apresentaram alterações significativas quanto a extração/lote que estimulassem repetições experimentais com estas soluções.

### **3.4.2 Efeito da concentração dos complexos**

Os ensaios de atividade iniciaram a partir da busca pelas melhores concentrações de complexos que fossem capazes de fornecer uma clivagem eficiente do DNA em uma condição que este não apresentasse degradação espontânea. Foram realizadas reações controles, na ausência dos complexos, nas mesmas condições reacionais para observar esta possível degradação espontânea. A partir destes resultados foram escolhidos os tempos reacionais e concentrações de complexos, adequados para observação da clivagem do DNA, utilizados nos próximos testes.

### **3.4.3 Efeito do pH**

O pH do meio reacional é de extrema importância na caracterização da atividade de complexos metálicos, principalmente naqueles com mecanismo predominantemente hidrolítico. Alterações das espécies tamponantes, bem como a disponibilidade de aceptores e doadores de elétrons, podem influenciar na desprotonação das águas

ligadas aos metais, dificultando a formação do nucleófilo (Mash *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2010b; Camargo *et al.*, 2010d; Osório *et al.*, 2012). Além disso, o pH tem um papel importante na manutenção da estrutura tridimensional das moléculas, sendo que algumas delas podem desnaturar ou sofrer modificações estruturais em soluções aquosas com pH extremados (Blackburn, 2006).

Para analisar o efeito do pH na clivagem do DNA plasmidial mediada pelos complexos estudados neste trabalho, foram realizados testes de clivagem deste DNA em diferentes tampões na concentração de 10mM sendo estes: MES (pH 5.5 e 6.0), HEPES (pH 7.0, 7.5 e 8.0) e CHES (pH 9.0), na presença de 5 $\mu$ M dos complexos. Os tampões foram selecionados por sua estabilidade e inércia em reação, citados como “Good buffers” (Mash *et al.*, 2003).

### 3.5 ANÁLISE DOS MODOS DE INTERAÇÃO

#### 3.5.1 Efeito da força iônica

Os grupos fosfatos presentes nos nucleotídeos do DNA são carregados negativamente a pH 7,0 conferindo uma carga negativa a macromolécula, portanto é plausível sugerir que complexos metálicos que possam se comportar como catiônicos em solução sejam responsáveis por um aumento da interação entre estes e o DNA através de forças eletrostáticas, contribuindo para ligação e consequente clivagem do DNA pelos complexos (Domingos, 2003). Deste modo, para confirmar se a interação destas moléculas com o DNA se dava através de interações eletrostáticas, por diferença de carga, foi adicionado na reação o sal NaCl nas concentrações de 5, 10, 25 e 50mM.

É necessário ressaltar que existe a possibilidade de os íons de  $\text{Cl}^-$  coordenarem com os centros metálicos dos complexos, diminuindo a atividade do complexo por outro motivo além da neutralização de cargas. Para excluir essa possível interferência foram realizados testes de força iônica substituindo o  $\text{NaCl}$  por  $\text{LiClO}_4$ , já que o íon  $\text{ClO}_4^-$  se associa mais fracamente ao centro metálico do que o íon  $\text{Cl}^-$ , neste ensaio foram utilizadas as mesmas concentrações do teste com  $\text{NaCl}$ , bem como a mesma concentração dos complexos ( $5\mu\text{M}$ ).

Além dessa coordenação comum do  $\text{Cl}^-$  com os centros metálicos, sabe-se que complexos com centro metálico  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  apontam uma capacidade de hidrolisar o DNA, logo sua atividade é dependente da formação de um nucleófilo ligado ao metal, sendo ainda mais necessário a exclusão da participação dos íons  $\text{Cl}^-/\text{ClO}_4^-$  na atividade destes complexos frente ao DNA. Todas as concentrações de  $\text{NaCl}$  e  $\text{LiClO}_4$  foram testadas em reações com DNA na ausência dos complexos para descartar possível degradação da molécula causada por estes sais.

### 3.5.2 Efeito dos ligantes de sulco

O reconhecimento molecular de pequenas estruturas sintéticas ao DNA é fundamental para a biologia estrutural bem como para o desenvolvimento e aprimoramento de fármacos e moduladores da expressão gênica (Morávek *et al.*, 2002; Terenzi *et al.*, 2016).

A ligação de pequenas moléculas por sulcos do DNA é um modo de associação intramolecular reversível caracterizado pela topografia e características químicas da molécula ligante (Kim e Nordén, 1993; Asatkar *et al.*, 2017). Os sulcos maiores e menores diferem significativamente em tamanho, forma, hidratação, potencial

eletrostático, e posição de sítios para pontes de hidrogênio (Oguey *et al.*, 2010). A associação por um sulco ou outro pode depender de diversas circunstâncias, por exemplo, a ligação ao sulco maior do DNA é um processo entálpico, enquanto a interação ao sulco menor é um processo favorecido por efeitos entrópicos (Breslauer *et al.*, 1987; Pages *et al.*, 2015).

Deste modo procurou-se determinar se a interação entre os complexos em estudo e o DNA se dava através do acesso de pelo menos um dos sulcos menor/maior do DNA. Para tal foram realizados ensaios na presença de ligantes conhecidos de ambos os sulcos, sendo estes a netropsina que se liga no sulco menor (Van Dyke *et al.*, 1982) e o verde de metila ligante do sulco maior (Kim e Nordén, 1993). Para isso os ligantes (50 $\mu$ M) foram pré-incubados com o DNA tamponado (10mM HEPES, pH 7.0) por 30min antes da adição dos complexos. Após a adição dos complexos (5 $\mu$ M) a reação foi incubada por 8h a 50°C. Ambos inibidores foram testados na ausência dos complexos e nenhuma clivagem de DNA superior ao controle (contendo somente DNA) foi observada.

### **3.5.3 Interação com CT-DNA**

O dicroísmo circular (CD) é um fenômeno espectroscópico originado a partir da interação de moléculas quirais com a luz circularmente polarizadas à esquerda e à direita (Nakanishi, 1999). O espectro de absorção do DNA é analisado comumente em um intervalo de comprimento de onda entre 180-300nm, faixa na qual as bases de DNA absorvem luz. Esta absorção da luz circularmente polarizada para direita

e esquerda pelo DNA difere, sendo esta diferença chamada de CD (Johnson, 1996).

O DNA em sua forma B (B-DNA) possui picos característicos de CD, sendo um negativo em 245nm resultante da helicidade direita deste DNA, e um pico positivo em 275nm devido ao empilhamento de bases (Nakanishi, 1999). Portanto, este método foi utilizado para verificar alterações na estrutura secundária do DNA.

Os ensaios de CD foram realizados com o espectropolarímetro de CD modelo J-815 (Jasco, USA). Uma amostra de 200 $\mu$ M de CT-DNA em 10mM de tampão (HEPES pH 7,0) foi titulada com concentrações crescentes dos complexos na razão de [Complexo]/[DNA] de 0,05 a 1. As varreduras foram realizadas na faixa de 220 a 500nm, a 20°C. Espectros contendo somente os complexos foram determinados na ausência de DNA, bem como somente na presença do solvente (acetonitrila) e nenhum sinal significativo foi encontrado.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE CLIVAGEM

#### 3.6.1 Efeito da clivagem na presença de um agente redutor

Como um modo de analisar a possibilidade de modular a atividade dos complexos frente ao DNA foram realizados ensaios de clivagem na presença do agente redutor ascorbato de sódio. Essa possibilidade de incremento da atividade é sugerida desde que Fenton (1876) descreveu a geração de espécies reativas de oxigênio através de uma série de reações envolvendo agentes redutores e oxidantes com o íon Ferro (Fenton, 1876). Deste modo foram realizados ensaios de clivagem de DNA plasmidial com a concentração de 5 $\mu$ M dos complexos deixados



reagir por 1h a 37°C na presença de 50µM de ascorbato de sódio (Wende e Kulak, 2015).

### **3.6.2 Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio**

Como já comentado anteriormente, complexos metálicos são capazes de clivar o DNA por dois mecanismos distintos: oxidativo e/ou hidrolítico. Desde que Sigman e colaboradores (1979) propuseram que um complexo metálico pode clivar o DNA através da geração de espécies reativas de oxigênio, procura-se investigar o mecanismo de clivagem para um novo complexo. As espécies reativas de oxigênio podem ser formadas a partir da redução do oxigênio molecular, que pode resultar em danos ao DNA por uma clivagem oxidativa (Jiang *et al.*, 2007; Butenko *et al.*, 2015; Raza *et al.*, 2016).

Para compreensão do mecanismo de clivagem do DNA (se por via hidrolítica ou oxidativa) pelos complexos analisados neste trabalho, foram adicionados às reações uma série de sequestradores de radicais livres, sendo estes DMSO (dimetil-sulfóxido) (0,4M) inibidor do radical hidroxila (OH•); KI (iodeto de potássio) (0,5mM), inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH); e NaN<sub>3</sub> (azida de sódio) (0,5mM) sequestrador de oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). A concentração dos complexos utilizada nestas reações foi de 5µM. Todos os sequestradores também foram testados na ausência dos complexos.

### **3.6.3 Efeito da ausência de oxigênio**

Com o intuito de confirmar o mecanismo de clivagem apontado pelos ensaios de sequestradores de espécies reativas de oxigênio e

verificar qual a influência do oxigênio molecular na clivagem do DNA pelos complexos, foram realizados testes de clivagem, nas condições padrão, porém na ausência de oxigênio, em atmosfera de argônio.

As soluções e misturas reacionais foram realizadas em uma “GloveBag”, sendo que estas foram desgaseificadas à vácuo e borbulhadas com argônio. Foi realizada também uma reação utilizando como agente de clivagem o complexo Fe-EDTA que tem a capacidade de oxidar a molécula do DNA apenas em aerobiose (Netto *et al.*, 1996; Jeff, 2016). Estas mesmas reações, incluindo o controle com Fe-EDTA, também foram realizadas na presença de oxigênio como um modo de comparar a clivagem do DNA pelos complexos nestas duas condições distintas. A concentração de complexo utilizada neste experimento foi de  $5\mu\text{M}$ .

### 3.7 CINÉTICA DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

A cinética de clivagem é um ponto chave para comparação de diferentes catalisadores quanto à sua eficiência. De modo geral as reações de cinética de clivagem foram realizadas conforme descrito: em um volume final de  $120\mu\text{L}$  foram adicionados  $2\mu\text{g}$  de DNA plasmidial em  $10\text{mM}$  de HEPES pH 7.0, em seguida foram adicionados  $30\mu\text{L}$  dos complexos em diferentes concentrações ( $0.5$ ,  $1$ ,  $2.5$ ,  $5$  e  $10\mu\text{M}$ ) e alíquotas de  $20\mu\text{L}$  foram retiradas em diferentes tempos ( $0$ ,  $1$ ,  $2$ ,  $4$ ,  $6$  e  $8\text{h}$ ) e submetidas a eletroforese em gel de agarose. As reações foram realizadas a  $50^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz. Controles nas mesmas condições reacionais, mas na ausência dos complexos, foram utilizados para observar a degradação espontânea do DNA. As constantes cinéticas de clivagem ( $k_{\text{obs}}$ ) foram calculadas para cada concentração do complexo, tomando estas reações

como de pseudo primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador (complexo) em relação do substrato (DNA). O valor de  $k_{obs}$  foi obtido diretamente a partir do coeficiente angular das regressões lineares originadas do plote do logaritmo natural da quantidade da forma intacta de DNA em função do tempo de reação.

### 3.8 INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

#### 3.8.1 Clivagem direta de oligonucleotídeos

Com o objetivo de buscar uma possível especificidade de clivagem dos complexos no que se refere a sequências nucleotídicas e estrutura do DNA uma série de testes foram realizados com a substituição do plasmídeo p-BSK-II por um oligonucleotídeo sintético como substrato (ATCG) (Figura 15). O oligonucleotídeo é composto por uma única fita que apresenta uma região auto-complementar de 42 nucleotídeos (21 pb), correspondendo a duas voltas completas de dupla hélice. Na extremidade 5' está ligado covalentemente o marcador fluorescente fluoresceína (FAM). Esta região de 21 pb possui duas subdivisões: uma rica em AT e outra em GC, além de uma região não pareada formada por 5 bases timina (*hairpin*). Utilizando essa molécula como substrato é possível verificar possíveis regiões preferenciais de clivagem pelos complexos. Além disso, o *hairpin* proporciona uma estrutura de fita simples diferente daquela encontrada na dupla-fita de DNA, agregando mais informações que podem ser obtidas a partir de ensaios de clivagem com este oligonucleotídeo.

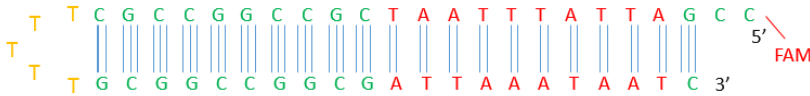


Figura 15. Representação da sequência do oligonucleotídeo de ATCG utilizado neste trabalho. Em vermelho e verde destacam-se as regiões ricas em AT e GC, respectivamente. Em amarelo, localiza-se o *hairpin loop* de TTTTT. O FAM refere-se ao grupo fluorescente fluoresceína ligada à extremidade 5'-fosfato do DNA.

Para estas reações uma amostra de oligonucleotídeo (2,5 pmol/ $\mu$ L) foi tamponada (HEPES 10mM pH 7,0) e submetida ao aquecimento a 95°C por 5min para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA. Em seguida, 7,5 $\mu$ L da amostra foram transferidos para os tubos de reação e mantidos em temperatura ambiente por 1h para permitir o correto anelamento do DNA. Por fim, o complexo (2,5 $\mu$ L) foi adicionado aos tubos e a reação foi mantida ao abrigo da luz por diferentes intervalos de tempo a 37°C. Demais informações acerca das concentrações de complexo utilizadas, o tempo total de reação e os tempos das retiradas das alíquotas estão claramente discriminados nas figuras e suas respectivas legendas na seção 4 de Resultados e Discussão. Ao final da reação, uma mistura de 1 $\mu$ L de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 1 $\mu$ L de glicogênio (20mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionadas às reações sendo, logo em seguida, adicionados mais 3x o volume corrigido da amostra (3 x 12 $\mu$ L = 36 $\mu$ L) de etanol 100% com objetivo de iniciar o processo de precipitação do oligonucleotídeo, finalizando assim a reação. As amostras foram então mantidas em precipitação em -20°C por pelo menos 16h. Em seguida, o DNA precipitado foi isolado por centrifugação (4°C, 16000 x g por 40min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 50 $\mu$ L de etanol 70% e re-centrifugado (4°C, 16000 x g por 10min).

O etanol 70% foi evaporado em um concentrador a vácuo e o DNA precipitado foi ressuscitado em 5 $\mu$ L de tampão de amostra desnaturante (80% de formamida, 10mM de NaOH, 1mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol).

As amostras de DNA já ressuscitadas foram então submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante (16% acrilamida:bis-acrilamida 19:1, TBE 1x e 7M de ureia). O gel (42cm x 33cm x 0,4mm) foi preparado em um volume total de 100mL e polimerizado com 0,6mL de persulfato de amônio (APS, 10% m/v) e 60 $\mu$ L de TEMED entre duas placas de vidro. O gel foi submetido a uma pré-corrida eletroforética por ~1h a 50W (~1700V) em TBE 1x até que a temperatura do gel atingisse ~50°C. Neste momento as amostras de DNA foram aquecidas por 3min a 95°C para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA e 4 $\mu$ L (~20pmols de DNA) de amostra foram aplicados em cada poço. Um marcador tipo Maxam-Gilbert A + G (Maxam, 1977) foi utilizado para identificar fragmentos terminados em A ou G.

A corrida eletroforética foi realizada com potência constante (50W) por pelo menos 150min. Em seguida, o gel ainda dentro das placas de vidro, foi digitalizado com ajuda do sistema de fotodocumentação FLA-9000 (Fuji) no modo de fluorescência específico para FAM.

### **3.8.2 Clivagem direta na presença de um agente redutor**

Nos ensaios de clivagem direta de oligonucleotídeos também foram realizadas reações na presença do agente redutor ascorbato de sódio na concentração de 50 $\mu$ M. Este agente foi empregado como um modo de forçar a geração de espécies reativas de oxigênio através da redução do

centro metálico destes complexos. Deste modo, estas espécies reativas são capazes de oxidar a molécula de DNA, ampliando a fragmentação de algumas regiões, principalmente daquelas onde o complexo está interagindo com a molécula. Estas reações foram realizadas com o complexo FeZn-L2 nas concentrações de 10, 50 e 500 $\mu$ M. A utilização de apenas um complexo da série é devido ao fato do objetivo deste experimento: avaliar a possibilidade de os metais do centro metálico desta série gerarem espécies reativas de oxigênio capazes de oxidar moléculas de oligonucleotídeo quando na presença de um agente redutor. Os tempos de reação para este ensaio foram de 0, 2, 6 e 24h. A metodologia de clivagem, preparação de amostra, corrida eletroforética e análise de resultados segue a mesma descrita no item 3.8.1.

### 3.8.3 Footprinting de DNA por Fe-EDTA

Uma outra técnica que permite a identificação de regiões específicas de interação de pequenas moléculas com DNA é a metodologia de DNA *footprinting* (Jeff, 2016). Nesta metodologia, um agente capaz de clivar o DNA com baixa especificidade de sequência nucleotídica é desafiado a fragmentar uma molécula de sequência conhecida na presença de pequenas moléculas (como complexos metálicos) na tentativa de encontrar sítios específicos onde a clivagem pelo agente é diminuída. Esta metodologia fornece muitas informações acerca da especificidade de complexos metálicos com DNA, principalmente aqueles que não possuem a capacidade de clivar o oligonucleotídeo (Bailly *et al.*, 2005; Jeff, 2016).

Deste modo, neste trabalho foi avaliado a capacidade do agente Fe-EDTA de clivar o oligonucleotídeo ATCG na presença ou ausência

dos complexos FeZn e FeCu. O resultado é interpretado a partir da comparação do perfil de clivagem do Fe-EDTA na ausência e presença de diferentes concentrações de complexos de modo a identificar mudanças no perfil de fragmentação do oligonucleotídeo provocado pelo Fe-EDTA. As alterações observadas dentro deste contexto, como a diminuição da clivagem pelo Fe-EDTA por exemplo, é um indício da interação dos complexos ao DNA, pois a ligação destas pequenas moléculas ao oligonucleotídeo inibe e/ou dificulta a clivagem proporcionada pelo Fe-EDTA. Portanto, os sítios de clivagem de Fe-EDTA que forem alterados na presença dos complexos estão próximos aos sítios de ligação destes complexos ao DNA. Desta forma, é possível verificar uma pegada (*footprinting*) no perfil de fragmentação da molécula (Figura 16). Os procedimentos utilizados nestes ensaios seguem o preconizado pela literatura (Kikuta *et al.*, 2002) com modificações.

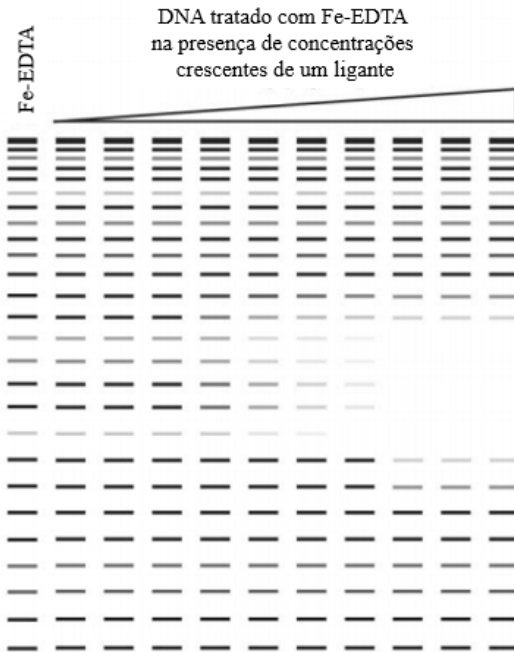


Figura 16. Representação de um gel de poliacrilamida desnaturalante contendo amostras de um ensaio de *footprinting* de DNA por Fe-EDTA. A primeira canaleta possui somente o DNA tratado com o complexo Fe-EDTA. Junto a esta amostra seguem as amostras de DNA que foram tratadas com Fe-EDTA na presença de concentrações crescentes de um determinado ligante, como um complexo metálico. É possível perceber que com o aumento da concentração do ligante ocorre uma diminuição da clivagem de algumas bandas pelo Fe-EDTA. Estes locais de menor clivagem aparentam uma proteção do DNA pelo ligante, podendo inferir que estes são os sítios de interação destas moléculas com o DNA. Adaptado de Urbach e Waring, (Urbach e Waring, 2005).

Para este experimento uma amostra de oligonucleotídeo ( $2,5\text{pmols } \mu\text{L}^{-1}$ ) foi tamponada com 10mM de HEPES (pH 7,0) e submetida ao aquecimento a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA. Em seguida a amostra foi transferida para os tubos de reação e mantida em



temperatura ambiente por 1h para permitir o correto anelamento do DNA. Após o resfriamento das amostras os complexos em diferentes concentrações foram adicionados e mantidos por 30min a temperatura ambiente para formação do equilíbrio complexo-DNA. A reação de clivagem de DNA se inicia com a adição de 2 $\mu$ L de cada uma das seguintes soluções: Fe-EDTA (40mM), ascorbato de sódio (40mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%) e deixados reagir por 90seg. Com a intenção de parar as reações foram adicionados após os 90seg 5 $\mu$ L de Tiuréia (0,5M). Em seguida foi adicionado à reação 1 $\mu$ L de glicogênio (20mg mL<sup>-1</sup>), 2,10 $\mu$ L de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 3x o volume corrigido da amostra de etanol 100% com o objetivo de iniciar o processo de precipitação do oligonucleotídeo, finalizando assim a reação. Todos os demais procedimentos para precipitação do oligonucleotídeo das amostras, ressuspensão, eletroforese e análise dos géis, segue o descrito no item 3.8.1.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL

#### 4.1.1 Efeito da concentração dos complexos

Os primeiros ensaios realizados com os complexos verificaram a atividade de clivagem do DNA plasmidial em diferentes concentrações, tempos e temperaturas. As primeiras reações foram realizadas em uma faixa de concentração de complexo entre 5 e 250 $\mu$ M, com tempos de incubação de 4, 8 e 16h à 37 e 50°C (dados não mostrados). Com o resultado deste experimento foi possível observar que todos os complexos foram capazes de clivar o DNA plasmidial em concentrações menores que 10 $\mu$ M; o uso de concentrações acima desta induziu a precipitação do DNA dificultando a avaliação de clivagem. Por este motivo os experimentos subsequentes não ultrapassaram uma concentração de 10 $\mu$ M de complexo. Com base nestes ensaios iniciais foram encontradas as melhores condições experimentais, chegando a conclusão de que a concentração mais segura para ensaios posteriores, na presença de outros compostos, seria a de 5 $\mu$ M. O tempo de reação selecionado foi de 8h devido ao incremento de atividade dos complexos em comparação às reações de 4h e a integridade do DNA utilizado como controle na reação ser maior neste tempo do que 16h, na qual há uma maior clivagem espontânea. A temperatura que proporcionou a melhor condição para a clivagem do DNA pelos complexos foi de 50°C, que apresentou um incremento de aproximadamente 2.37 vezes em relação à temperatura de 37°C (Figuras 17 a 21). Portanto, as condições adotadas para os ensaios apresentados a seguir foram: temperatura de 50°C, tempo de 8h e concentração de 0 a 10 $\mu$ M.

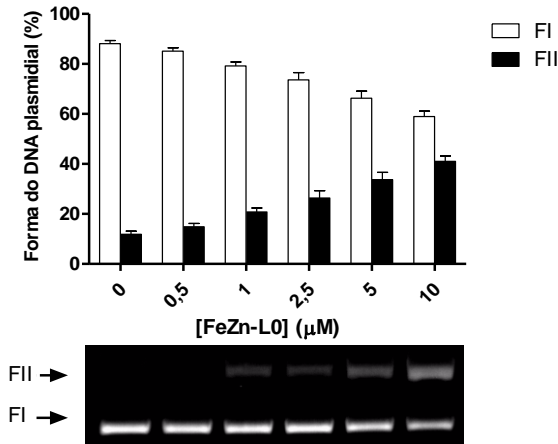


Figura 17. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L0 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a  $10\mu\text{M}$ ; Temperatura =  $50^\circ\text{C}$ ; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

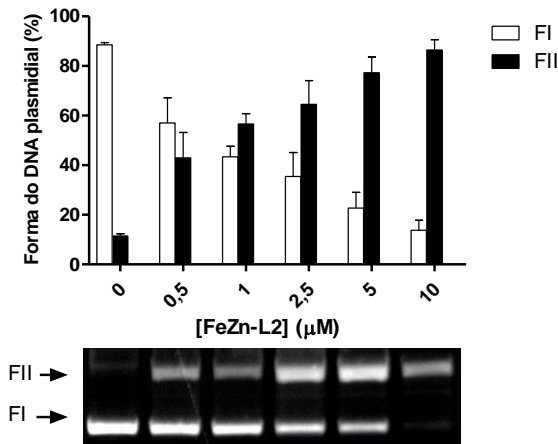


Figura 18. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L2 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a  $10\mu\text{M}$ ; Temperatura =  $50^\circ\text{C}$ ; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

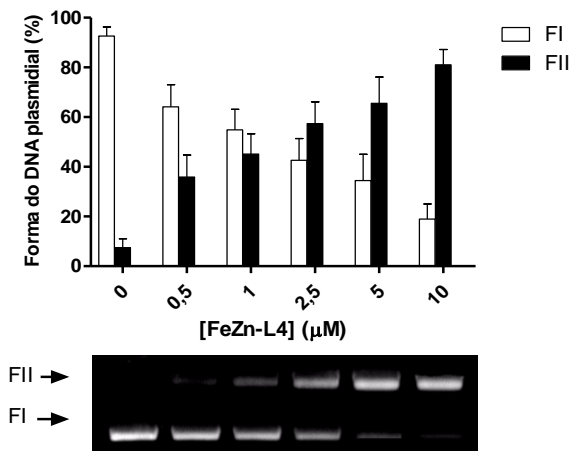


Figura 19. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L4 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a  $10\mu\text{M}$ ; Temperatura =  $50^\circ\text{C}$ ; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

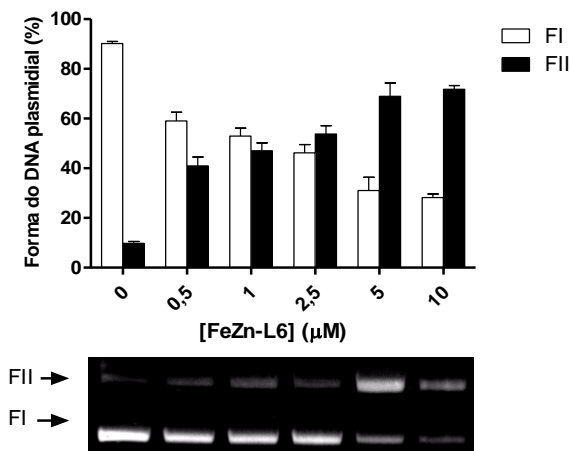


Figura 20. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L6 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a  $10\mu\text{M}$ ; Temperatura =  $50^\circ\text{C}$ ; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

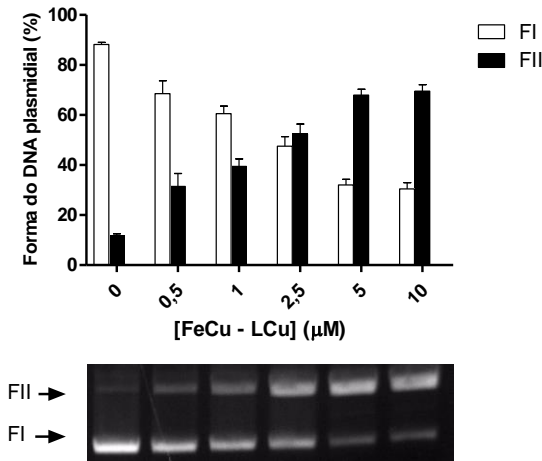


Figura 21. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeCu-Lc em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão]= HEPES (10mM, pH 7.0); [Complexo] = 0,5 a  $10\mu\text{M}$ ; Temperatura =  $50^\circ\text{C}$ ; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Todos os complexos foram capazes de clivar o DNA de modo concentração-dependente, ou seja, a medida que a concentração de complexo foi aumentada no meio reacional aumentou também sua capacidade de clivar o DNA. Os complexos FeZn-L4, FeZn-L6 e FeCu-Lc mostraram um perfil semelhante de atividade na primeira concentração testada ( $0,5\mu\text{M}$ ), promovendo uma quebra simples no DNA superenovelado gerando aproximadamente 40% da forma circular aberta do DNA (FII). Já o complexo FeZn-L0 apresentou este mesmo potencial de clivagem apenas em sua maior concentração ( $10\mu\text{M}$ ), sendo este então o complexo menos ativo da série. O complexo FeZn-L2 se mostrou como o mais ativo deles, gerando aproximadamente 60% de FII do DNA em sua menor concentração, enquanto a maior concentração utilizada neste ensaio ( $10\mu\text{M}$ ) gerou aproximadamente 95% de quebra do DNA. Nesta

última concentração o potencial de clivagem dos complexos FeZn-L2 e FeZn-L4 foram muito semelhantes, porém, na concentração utilizada para os ensaios posteriores (5 $\mu$ M) como sendo a mais segura, sem possibilidade de precipitação de DNA, o complexo FeZn-L2 apresentou maior potencial de clivagem (~80%) enquanto o complexo FeZn-L4 gerou ~65% de DNA circular aberto.

O incremento nas cadeias carbônicas a partir do complexo FeZn-L0 contribuiu para um aumento da atividade dos complexos no que se refere à clivagem de DNA como já discutido anteriormente. Esta maior reatividade dos complexos que possuem as caudas com o grupo amino na extremidade pode ser explicada pela diferença de carga entre este grupo, que quando protonado possui carga positiva, enquanto o DNA possui uma natureza aniônica, facilitando a formação do sistema complexo-DNA (Blackburn, 2006; Pages *et al.*, 2015).

O aumento do número de átomos de carbono na cadeia não foi proporcional ao aumento da atividade dos complexos na clivagem do DNA plasmidial. Isto pode ser observado nos resultados de ensaio de clivagem onde o complexo que possui a cadeia com 2 carbonos (FeZn-L2) é o que apresenta maior atividade, e não aqueles que possuem as maiores cadeias carbônicas. Isto pode se dar por uma facilidade deste complexo com menor cadeia de interagir com o DNA sem que haja um impedimento estérico devido ao tamanho de sua estrutura. Além disso, as cadeias maiores (4 ou 6 carbonos) podem conduzir o grupo amino próximo ao nucleófilo, e uma interação entre estes grupos podem diminuir a atividade do complexo na clivagem do DNA (Camargo, 2013). Ensaios de cinética de clivagem são capazes de demonstrar com mais facilidade o efeito deste incremento das cadeias de carbono com grupos

amino na interação e clivagem do DNA, já que estas alterações de segunda esfera de coordenação parecem não somente alterar a atividade de clivagem, mas também a afinidade dos complexos pelo DNA. Isto é de extrema importância para a manutenção e estimulação de uma atividade de clivagem sítio-específica, como já comentado por outros autores que trabalharam com complexos similares (Neves *et al.*, 1996; Jovito, 2010; Peralta *et al.*, 2010; Camargo, 2013).

#### **4.1.2 Efeito do pH**

O pH do meio racional pode alterar o modo como a clivagem de DNA por complexos metálicos ocorre, tendo em vista que complexos metálicos que tendem a um mecanismo hidrolítico sofrem grande alteração de atividade em pH diferentes. Sendo os complexos utilizados neste trabalho derivados do complexo metálico FeZnOH, (Peralta *et al.*, 2010) que cliva o DNA por um mecanismo hidrolítico, faz-se necessário a análise da atividade destes em função do pH (Camargo *et al.*, 2010b; Camargo *et al.*, 2010d; Massoud *et al.*, 2014). O teste foi realizado apenas com os complexos FeZn-L2, tendo em vista que a única alteração nos complexos com este centro metálico é a inserção da cadeia carbônica, e FeCu-Lc, já que este complexo pode apresentar um mecanismo de clivagem diferente devido a presença do íon cobre em substituição ao zinco dos demais complexos. Os resultados mostram que a atividade de ambos os complexos possui uma dependência à variação de pH, com uma atividade ótima em pH 7.0. O complexo FeZn-L2, quando analisada sua atividade em função do pH apresentou um perfil de sino, como pode ser observado na Figura 22. Este comportamento concorda com o perfil



observado para a hidrólise do éster de fosfato 2,4-BDNPP, utilizado como mimético da ligação fosfodiéster (Camargo, 2013).

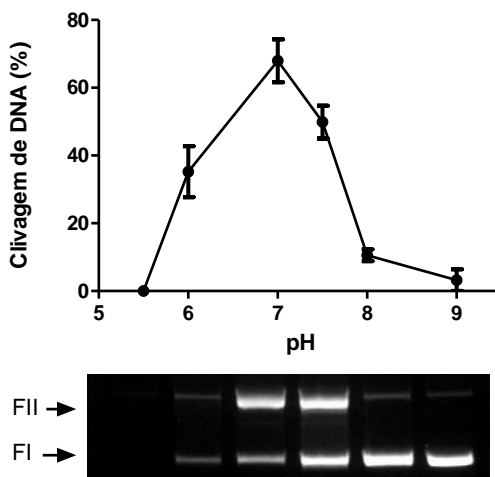


Figura 22. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeZn-L2 com variação de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM; (MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES pH 9.0); [Complexo FeZn-L2] = 5 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

O resultado de ensaio de pH é um primeiro indicativo de que o mecanismo de clivagem de DNA pode se assemelhar aquele proposto por Camargo (2013) para a hidrólise do substrato artificial 2,4-BDNPP (Figura 23). No referido trabalho foi sugerido que o substrato coordena-se com o Zn<sup>II</sup> e uma molécula de água ligada ao Fe<sup>III</sup> sofre uma desprotonação gerando um íon hidróxido que promove o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo da ligação fosfodiéster (Camargo, 2013). O resultado de pH sugere um mecanismo hidrolítico para estes complexos, uma vez que complexos metálicos que possuem este mecanismo apresentam grandes alterações de potencial de clivagem com

a mudança de espécies tamponantes, como mostrado neste experimento. Ensaio subsequentes com sequestradores de espécies reativas de oxigênio e em atmosfera de argônio irão buscar a confirmação deste mecanismo.

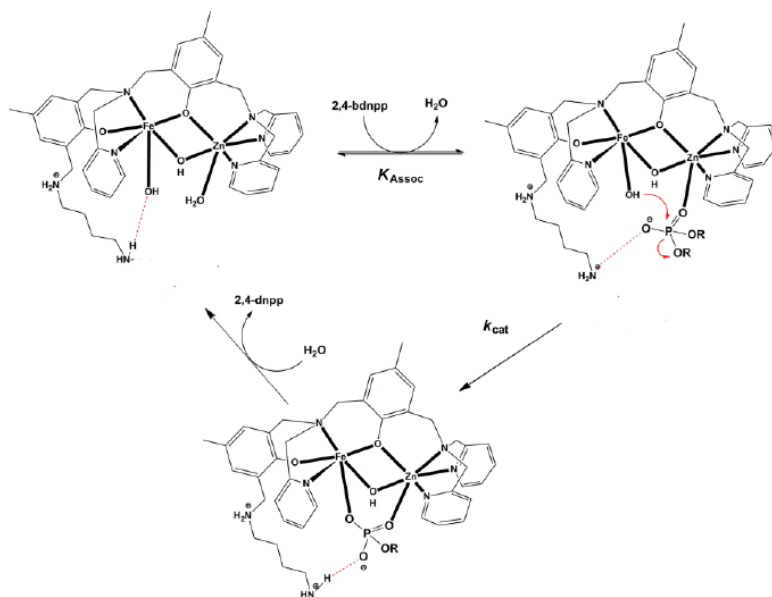


Figura 23. Proposta do mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo FeZn-L4. Na primeira etapa o substrato coordena-se ao centro de  $Zn^{II}$  pelo deslocamento de uma molécula de água. Em seguida o íon hidróxido presente no centro de  $Fe^{III}$  atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a consequente liberação do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico. Retirado de Camargo (2013).

Foi realizado também o ensaio de clivagem de DNA plasmidial com alteração do meio tamponante na presença do complexo FeCu-Lc. Como já mencionado, pelo fato da substituição do zinco por cobre deste centro metálico, faz-se necessário a caracterização do perfil de atividade

deste complexo em diferentes faixas de pH. O resultado deste ensaio está apresentado na Figura 24.

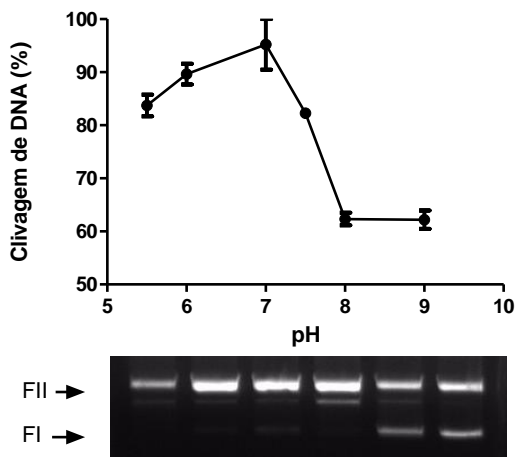


Figura 24. Clivagem de DNA plasmidial com variação de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM; (MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES pH 9.0); [Complexo FeCu-Lc] = 5 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo da luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

O resultado do ensaio com o complexo FeCu-Lc mostra também uma atividade dependente de pH, porém apresentando um perfil diferente do complexo FeZn-L2. Esta diferença pode ser resultante de um mecanismo diferente de clivagem devido à presença do íon cobre, que pode alterar as espécies moleculares envolvidas no processo de catálise. Além disso, metais de transição, como o Cu<sup>II</sup>, podem gerar espécies reativas de oxigênio através de reações tipo Fenton, clivando o DNA através de um mecanismo oxidativo (Asatkar *et al.*, 2017). O mecanismo de clivagem deste complexo, assim como dos demais, foram caracterizados e estão mostrados em ensaios subsequentes. Todavia, este

complexo, assim como o complexo FeZn-L2, apresentou sua atividade ótima em pH 7.0, o qual foi adotado para todos os ensaios posteriores.

## 4.2 ANÁLISE DOS MODOS DE INTERAÇÃO

### 4.2.1 Efeito da força iônica

Um dos modos de interação entre pequenas moléculas com o DNA corresponde às interações eletrostáticas. Tendo em vista que, nas condições reacionais utilizadas neste trabalho os grupos fosfato da ligação fosfodiéster apresentam-se carregados negativamente (Domingos, 2003), interações eletrostáticas podem ser um dos mecanismos responsáveis pela ligação dos complexos utilizados neste trabalho com o DNA. Ao neutralizar estas cargas com a adição de agentes externos é sugerido que esta afinidade possa ser modulada. Além disso, nos complexos que possuem a cadeia carbônica (FeZn-L2, L4, L6 e FeCu-Lc) encontram-se grupos amino, que no meio reacional em pH 7.0 apresentam-se desprotonados, assumindo uma carga catiônica contribuindo para existência de interações iônicas entre estes e o DNA, que neste mesmo meio reacional possui um caráter aniônico (Camargo, 2013). Deste modo, foram realizadas reações de clivagem na presença dos sais NaCl e LiClO<sub>4</sub>, com a intenção de neutralizar estas cargas que podem estar envolvidas no processo de catálise, diminuindo esta interação quando presente.

Os resultados da clivagem do DNA pelos complexos FeZn-L0, FeZn-L2, FeZn-L4, FeZn-L6 e FeCu-Lc na concentração de 5µM sob diferentes concentrações de NaCl estão mostrados nas Figuras 25 a 29. Os resultados mostram que com o aumento gradativo da concentração de NaCl (5 a 50mM) no meio reacional, há uma diminuição parcial da

clivagem do DNA por todos os complexos. O complexo FeZn-L0 apresentou uma diminuição de ~77% de clivagem na presença de 50 mM de NaCl quando comparado com a reação padrão de clivagem (sem a presença do sal). Os complexos FeZn-L2 e FeZn-L4 apresentaram ~80% de inibição, e os complexos FeZn-L6 e FeCu-Lc diminuíram sua atividade em ~75% nesta mesma concentração de NaCl.

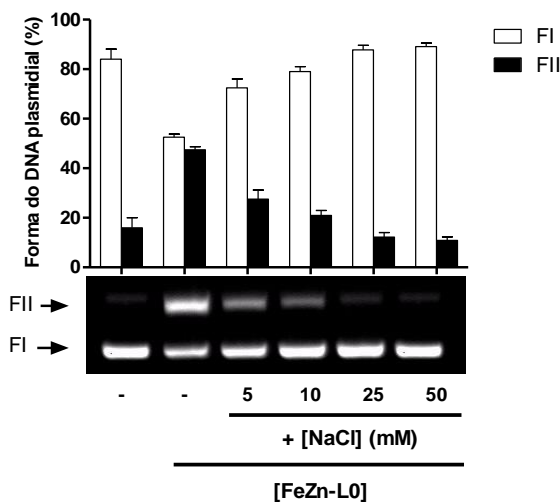


Figura 25. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

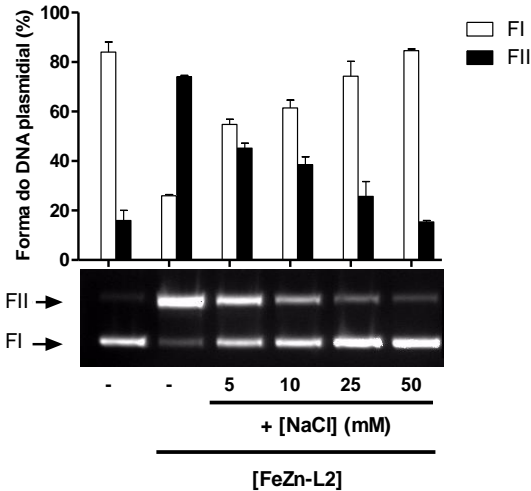


Figura 26. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

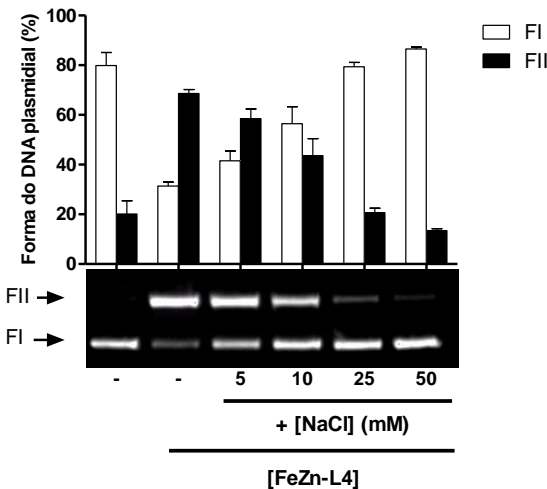


Figura 27. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

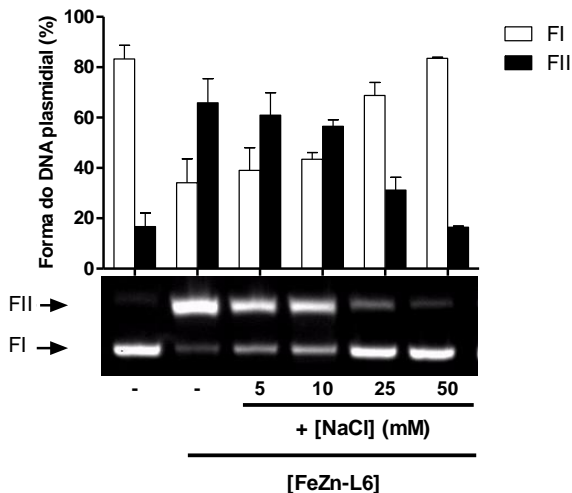


Figura 28. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25 $\mu$ M; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

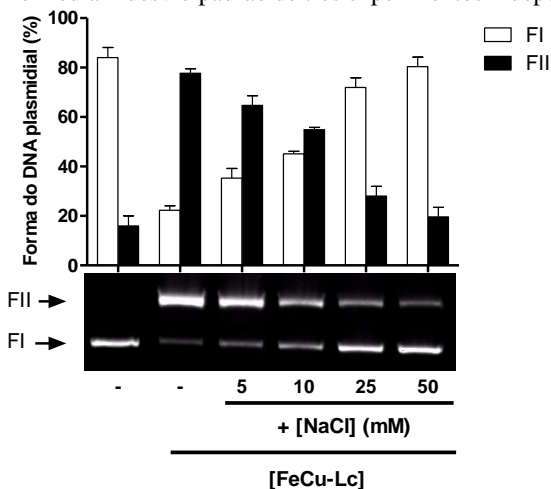


Figura 29. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeCu-Lc em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~25 $\mu$ M; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [NaCl] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Os íons de  $\text{Na}^+$  tendem a estabilizar a conformação do DNA, reduzindo a repulsão dos grupos fosfato carregados negativamente (Altmann, 1889; Blackburn, 2006), podendo assim diminuir a interação do complexo ao fosfato dificultando o processo de catálise, o que pode ser observado nestes resultados. Além disso, os complexos que possuem a cadeia carbônica com amina tiveram resultados semelhantes aos já encontrados para a hidrólise do 2,4-BDNPP, onde a amina carregada na cadeia carbônica contribui positivamente para a estabilização do grupo fosfato no sítio catalítico (Camargo, 2013). A diminuição da clivagem do DNA plasmidial pelos complexos também ocorreu quando o  $\text{NaCl}$  foi substituído por  $\text{LiClO}_4$  (Figuras 30 a 34 e Tabela 1). Isso reforça o pressuposto de que os íons  $\text{Na}^+$  possuem o papel fundamental de neutralização e estabilização das cargas do DNA. Além disso, indica que os íons  $\text{Cl}^-/\text{ClO}_4^-$  não atuam diretamente no processo de catálise, ou interferem na reação catalítica. A relação entre o aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  e a diminuição do potencial de clivagem dos complexos já foi visualizado para complexos similares (Camargo *et al.*, 2015), como para o  $\text{FeZnOH}$  de Peralta e colaboradores (2010), e também para complexos diferentes (Auras *et al.*, 2016), e parece corroborar com o mecanismo de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (Peralta *et al.*, 2010; Camargo, 2013).



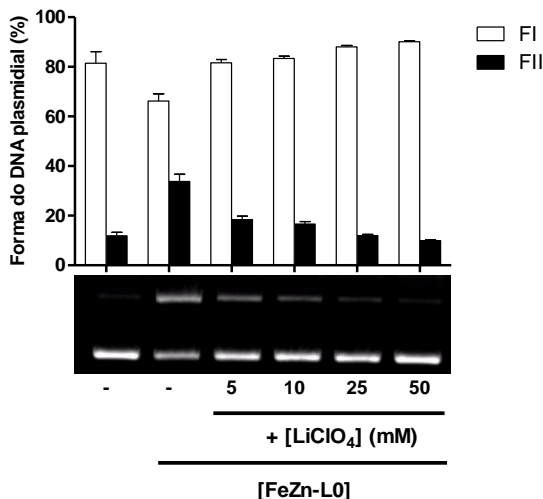


Figura 30. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = Hapes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5μM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

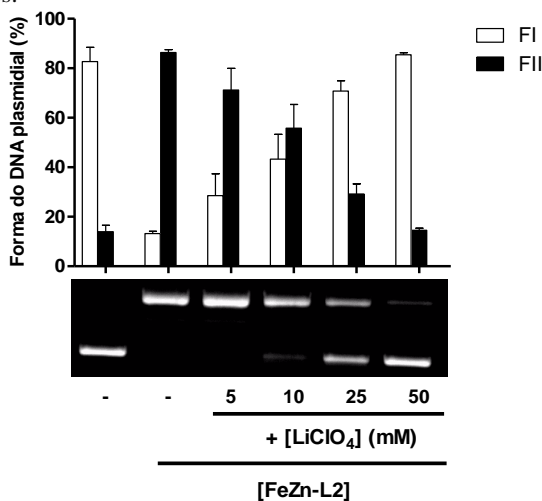


Figura 31. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = Hapes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5μM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz.

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

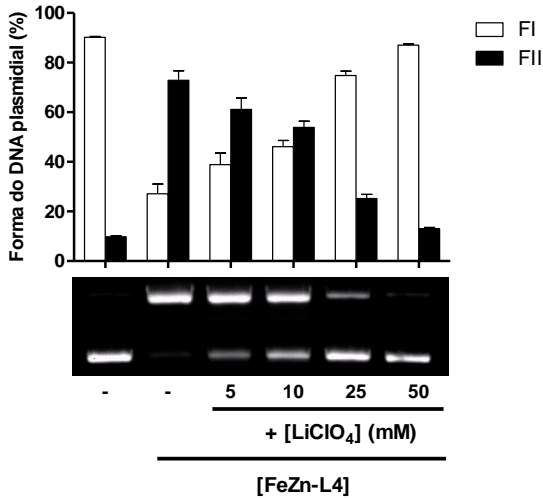


Figura 32 . Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

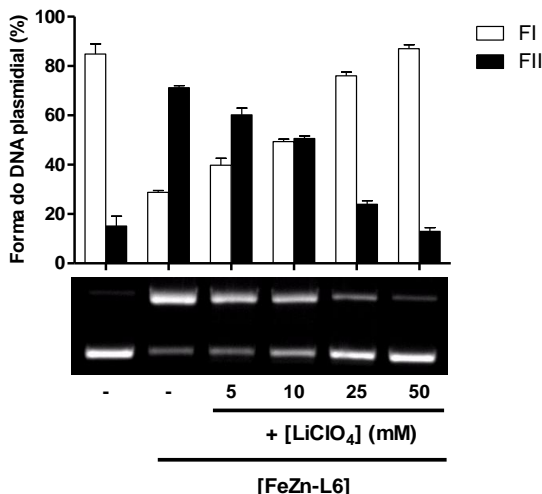


Figura 33. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = Hapes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5μM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

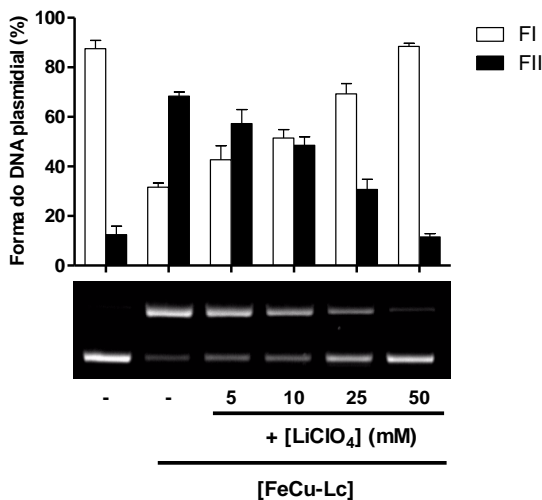


Figura 34 . Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0 em função de diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = Hapes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5μM; [LiClO<sub>4</sub>] = 5-10mM; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz.

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Tabela 1. Comparação da inibição da atividade de clivagem pelos complexos FeZn-L0, FeZn-L2, FeZn-L4, FeZn-L6 e FeZn-Lc quando expostos as maiores concentrações de NaCl e LiClO<sub>4</sub> testadas (50mM).

Complexo	Inibição de clivagem por	Inibição de clivagem por
	NaCl (%)	LiClO <sub>4</sub> (%)
FeZn-L0	$\pm 77$	$\pm 71$
FeZn-L2	$\pm 80$	$\pm 81$
FeZn-L4	$\pm 80$	$\pm 82$
FeZn-L6	$\pm 75$	$\pm 79$
FeZn-Lc	$\pm 75$	$\pm 82$

#### 4.2.2 Efeito dos ligantes de sulco

Outra abordagem para avaliar o modo de interação dos complexos metálicos à estrutura do DNA é através da adição de ligantes de sulcos maior ou menor à reação de clivagem. Estes ligantes bloqueiam o acesso dos complexos a estes sulcos, possibilitando a determinação do possível sítio de ligação dos complexos ao DNA. Os resultados de clivagem do DNA plasmidial na presença dos ligantes de sulco maior e menor estão dispostos nas Figuras 35 a 39. Os dados mostram que o complexo FeZn-L0, que não possui a cadeia carbônica como alteração em sua segunda esfera de coordenação, teve uma maior inibição da clivagem quando utilizado o ligante de sulco menor netropsina, indicando que este complexo pode atuar principalmente acessando o DNA através do

mesmo, enquanto a utilização do ligante de sulco maior verde de metila não afetou significativamente a clivagem deste complexo. O mesmo foi visto por Peralta (2010), onde o ligante de sulco maior também não mostrou alteração do potencial de clivagem do complexo FeZnOH (Peralta *et al.*, 2010), resultados que também foram observados com complexos que possuem ligantes semelhantes (Camargo *et al.*, 2010).

Por outro lado o complexo FeZn-L2, que possui a cadeia com dois carbonos, teve sua clivagem parcialmente inibida por ambos ligantes de sulco, indicando que este complexo não possui especificidade quanto aos sulcos, mas que seja necessária a interação com um destes para que o processo de clivagem ocorra. Os complexos FeZn-L4 e FeZn-L6, que possuem as cadeias com quatro e seis carbonos respectivamente, tiveram uma inibição maior da clivagem quando utilizado o verde de metila, ligante de sulco maior, sugerindo que estes complexos, por possuírem uma maior cadeia de carbono, acessam o DNA preferencialmente pelo sulco maior. O empilhamento de bases nitrogenadas no sulco maior do DNA aparenta expor principalmente o N-7 de purinas, e alguns metais de transição, como o Cu, o Zn e o Ti, já foram caracterizados como ligantes evidentes destes grupos nitrogenados nestas regiões do DNA (Barton, 1994). O complexo FeCu-Lc não teve sua clivagem alterada na presença dos ligantes, sugerindo que este complexo não apresenta preferência quanto aos sulcos para acessar o DNA.

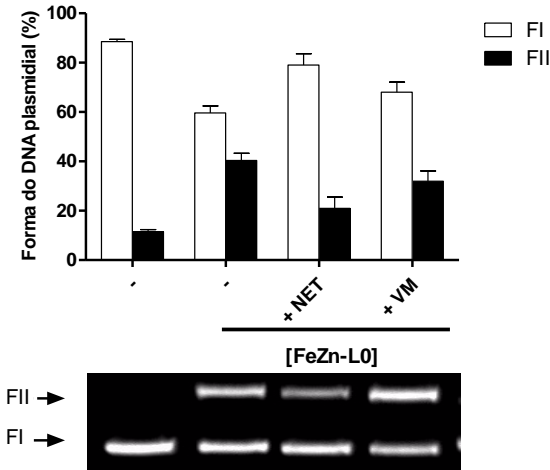


Figura 35. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [Net] ou [VM] = 50 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

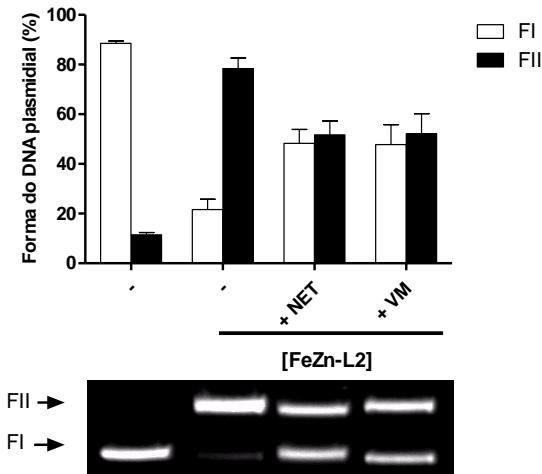


Figura 36. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [Net] ou [VM] = 50 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

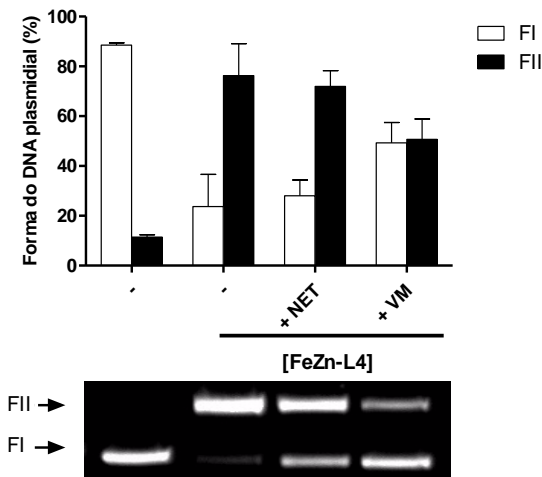


Figura 37. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [Net] ou [VM] = 50 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

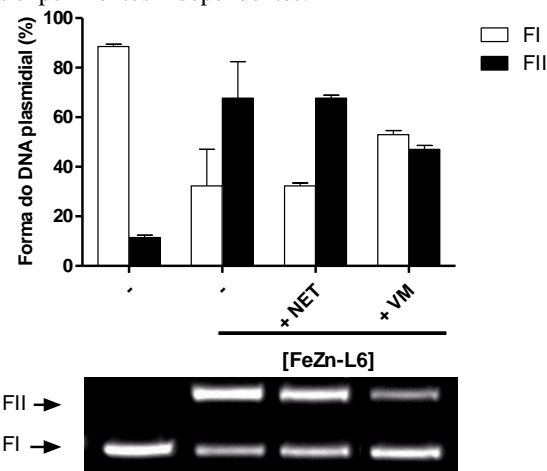


Figura 38. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [Net] ou [VM] = 50 $\mu$ M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

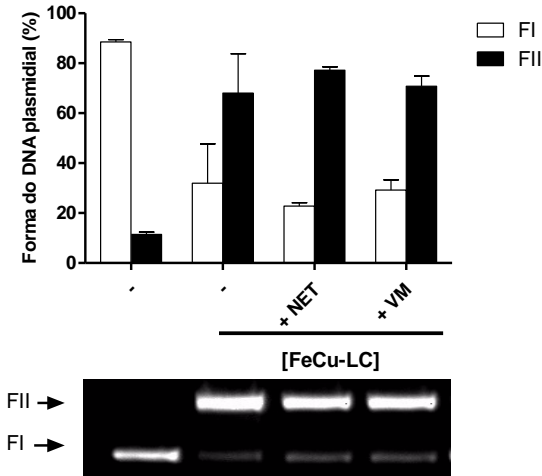


Figura 39. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeCu-Lc, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [Net] ou [VM] = 50  $\mu$ M; Temperatura = 50 °C; Tempo = 8 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

A interação com sulco menor e a intercalação são os principais modos de associação não covalente de pequenas moléculas ao DNA, a qual na maioria das vezes é favorecida pelas diferenças de carga. Além disso, estas interações podem depender das condições do ambiente da reação, como temperatura, pH, força iônica e até mesmo a sequência de bases do DNA, já que as interações com sulco menor parecem ser favorecidas por regiões ricas em A-T (Barton *et al.*, 1986; Pages *et al.*, 2015), por isso se faz necessário a realização de outros ensaios que possam indicar com mais precisão os modos de interação dos complexos metálicos com DNA.



### 4.2.3 Interação com CT-DNA

O terceiro modo de avaliar o mecanismo de interação dos complexos ao DNA foi realizado através da espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Por meio desta técnica é possível analisar algumas mudanças na estrutura secundária de CT-DNA, através do acompanhamento de alterações de bandas características do DNA que indicam o empilhamento de bases e a helicidade direta da dupla-fita. Os resultados destes ensaios são apresentados nas Figuras 40 a 44 e demonstram que, com a adição de concentrações crescentes dos complexos ao CT-DNA (200  $\mu\text{M}$ ) na razão  $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}]$  de 0,1 a 1, as alterações no sinal de CD das bandas típicas 275 e 245 nm mantiveram-se semelhantes para todos os complexos, sendo que com o aumento da concentração destes a intensidade de ambas foi reduzida. Ensaios paralelos utilizando somente o solvente dos complexos não provocaram alterações no espectro de CD, demonstrando, portanto, não se tratar de um simples efeito de diluição.

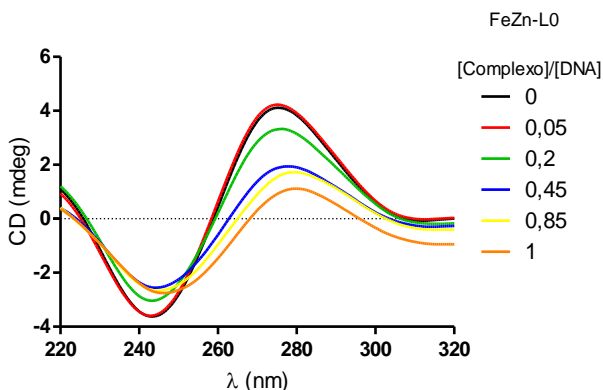


Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L0. Condições reacionais:  $[\text{CT-DNA}] = 200\mu\text{M}$ ;  $[\text{Tampão}] = 10\text{mM}$  de HEPES pH 7,0;  $[\text{complexo}] = 0$  a  $181\mu\text{M}$ ; Temperatura =  $20^\circ\text{C}$ .

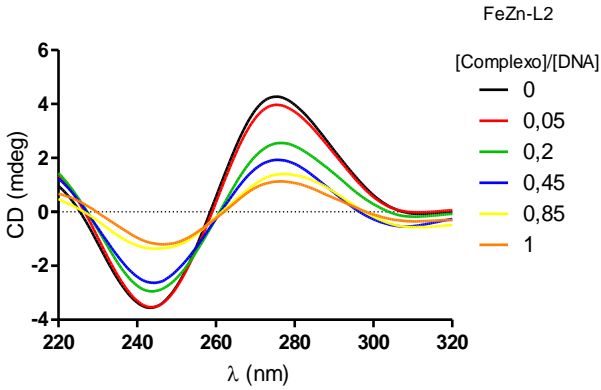


Figura 41. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L2. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 $\mu$ M; Temperatura = 20°C.

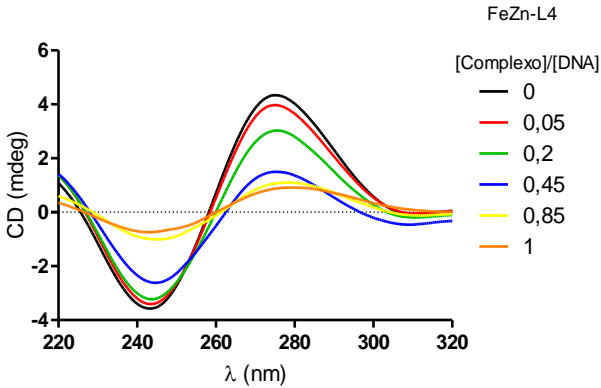


Figura 42. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L4. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 $\mu$ M; Temperatura = 20°C.

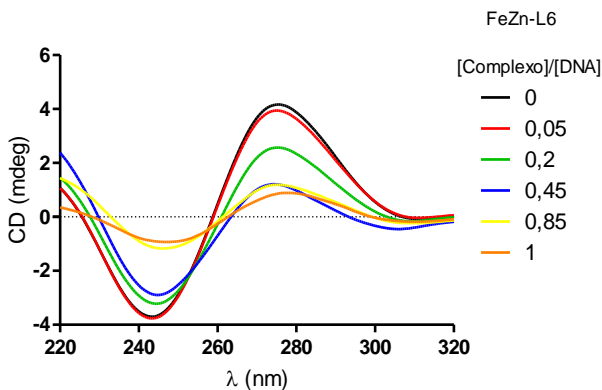


Figura 43. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeZn-L6. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 $\mu$ M; Temperatura = 20°C.

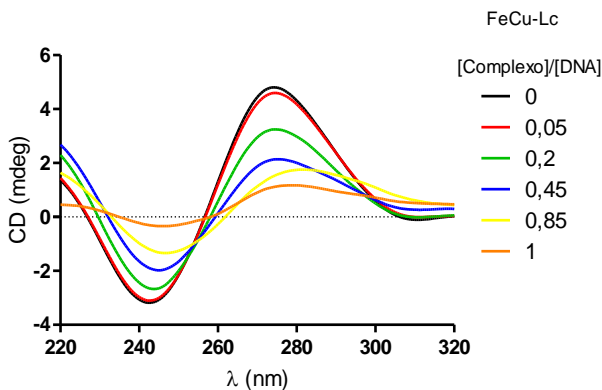


Figura 44. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo FeCu-Lc. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu$ M; [Tampão] = 10mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 $\mu$ M; Temperatura = 20°C.

Estes resultados indicam que todos os complexos são capazes de alterar a estrutura secundária do DNA de modo semelhante. A diminuição da intensidade das típicas bandas do DNA em 275 e 245 nm mostra o

oposto das alterações provocadas no DNA quando submetidos a este experimento na presença de moléculas intercalantes como o brometo de etídeo (Parodi, 1975) ou azul de metileno (Norden, 1982). Estas moléculas tendem a aumentar a intensidade do sinal de CD de pelo menos uma destas bandas (Tavakolyanpour *et al.*, 2016), diferente dos resultados encontrados neste trabalho. Ao analisar cada banda percebe-se que a ligação dos complexos diminui a helicidade direita do DNA, resultando em uma perda de torção deste, o que conseqüentemente altera também o empilhamento de bases (Nakanishi, 1999). Estas alterações também já foram reportadas em estudos com complexos que interagem com o DNA majoritariamente através dos sulcos do que por intercalação (Dehkordi, 2011; Derakhshankhah, 2012; Shahabadi, 2014).

Estes resultados, em conjunto com os demais encontrados nesta seção de avaliação dos modos de interação, sugerem que todos os complexos são capazes de se ligar ao DNA por modos semelhantes. Esta interação parece ser favorecida por diferenças de cargas entre os complexos e o DNA como apresentado no item 4.2.1. Além disso, os resultados de ensaio de clivagem na presença de ligantes de sulco indicam que os complexos acessam o DNA através de um dos sulcos, excetuando-se o complexo FeCu-Lc que não apresentou uma preferência de interação por um destes. De um modo geral, sugere-se que estes complexos são capazes de interagir com o DNA através de interações eletrostáticas, acessando e clivando o DNA através dos sulcos, onde as ligações fosfodiéster e as bases nitrogenadas estão mais expostas, o que facilita a clivagem (Pages *et al.*, 2015).

### 4.3 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE CLIVAGEM

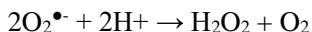
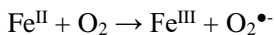
Alguns complexos metálicos possuem a capacidade de clivar o DNA por um mecanismo oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio na presença de um co-reagente (reductor; ditioneitol e oxidante; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fazendo-se necessária a investigação do mecanismo de clivagem para um novo complexo. Quando há tanto um reductor como um oxidante, a reação tipo-Fenton (abaixo) é a principal via utilizada na clivagem oxidativa do DNA (Fenton, 1876). Nestes casos, o metal reduzido (no exemplo Fe<sup>II</sup>) reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerando como ERO o radical hidroxila (•OH) que é um forte oxidante (Halliwell, 2007; Chitrapriya *et al.*, 2015).

Esquema 1



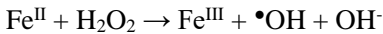
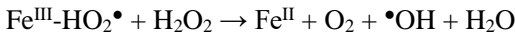
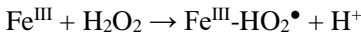
Na presença somente de um agente reductor (o ascorbato neste exemplo), o mecanismo sofre algumas alterações, onde o metal é reduzido pelo agente reductor o qual reage com o oxigênio molecular gerando como ERO o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que rapidamente dismuta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e participa na geração de •OH.

Esquema 2



O  $\text{Fe}^{\text{III}}$  pode também gerar ERO mesmo na presença somente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Pecci *et al.*, 1997), sendo que o  $\text{Fe}^{\text{III}}$  reage com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerando uma espécie tipo metal-peróxido. Este por sua vez reage com outra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando um equivalente de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  e o próprio radical  $\text{OH}^\bullet$ .

Esquema 3



Deste modo, alguns complexos que necessitam de um co-reagente para que o processo de clivagem ocorra irão apresentar uma mecansimo oxidativo. Esse co-reagente pode ser um oxidante como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{KHSO}_5$  (Sreedhara *et al.*, 2000; Patwardhan e Cowan, 2001; Chitrapriya *et al.*, 2015) ou um redutor como o ascorbato, 3-ácido mercaptopropanóico ou ditiotreitol (Jin *et al.*, 2007; García-Giménez *et al.*, 2009; Gómez-García *et al.*, 2016). Em alguns casos é necessário a presença de ambos co-reagentes na reação (oxidante e redutor) (Gómez-García *et al.*, 2016).

#### 4.3.1 Efeito da clivagem na presença de um agente redutor

Como um modo de avaliar se a atividade dos complexos pode ser modulada na presença de um co-reagente, neste caso o ascorbato de sódio, foram realizadas reação de clivagem com todos os complexos em estudo na presença de  $50\mu\text{M}$  de ascorbato de sódio em um tempo de incubação de 1h a  $37^\circ\text{C}$ . O tempo de reação e temperatura deste ensaio diferiram

daqueles padrões (8h a 50°C) devido aos resultados de clivagem encontrados para os complexos nestas condições experimentais. Os dados de clivagem estão apresentados na Figura 45.

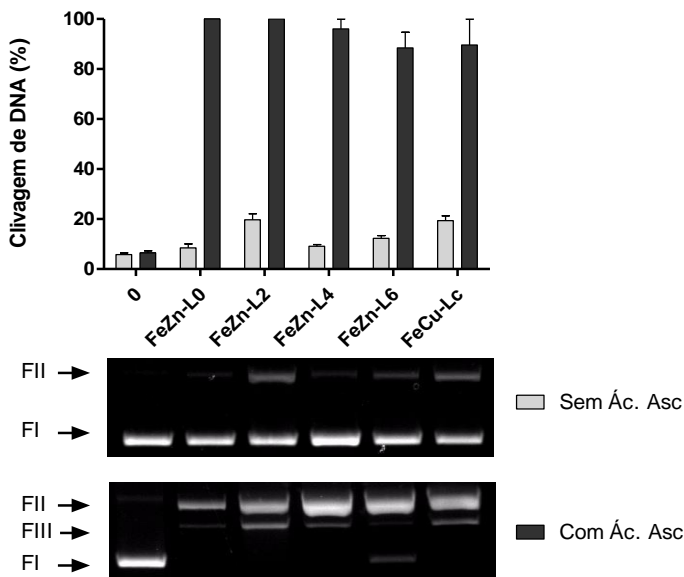


Figura 45. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II na presença de agente redutor. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 5 $\mu$ M; [Ascorbato] = 50 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 1h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Com base neste experimento foi possível perceber que os complexos são capazes de ter sua atividade modulada na presença de um agente externo, como no caso do ascorbato de sódio. É possível propor neste caso que o ascorbato atue reduzindo o Fe<sup>III</sup> para Fe<sup>II</sup> e gere espécies reativas de oxigênio através de reações de Fenton (Fenton, 1876), conforme apresentado no esquema 2 do item 4.3. O mesmo mecanismo vale para o complexo com centro metálico FeCu, onde o Cu<sup>II</sup> inicia a reação a partir da redução pelo ascorbato.

Estes resultados apontam um possível controle do incremento de atividade destes complexos, sendo possível aumentar em até nove vezes a atividade de clivagem em um tempo curto de reação (1h). Esta abordagem se torna interessante para o emprego destes complexos em metodologias que requerem uma clivagem relativamente alta de DNA para avaliação de interação drogas-DNA, por exemplo, como a técnica de DNA *footprinting* (Jain e Tullius, 2008; Jeff, 2016).

Vale ressaltar que os complexos aqui utilizados são capazes também de clivar o DNA plasmidial na ausência de um co-reagente, não excluindo a possibilidade de estes agirem no DNA através de um mecanismo de hidrólise. A geração de espécies reativas de oxigênio neste ensaio na presença de um agente redutor foi ocasionada por meio de um “artefato”, forçando a oxidação da molécula.

#### **4.3.2 Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio**

Conforme observado no ensaio de clivagem na presença de um agente redutor, os complexos foram capazes de clivar o DNA com grande eficiência na presença de ascorbato. Todavia, como já visto em ensaios anteriores, na ausência deste também há uma alta atividade de clivagem. No entanto, por não necessitar de um co-reagente para que a clivagem ocorra um mecanismo hidrolítico pode ser sugerido erroneamente para estes complexos, já que alguns são capazes de sofrer diferentes processos redox sem a participação de co-reagentes gerando espécies reativas ou oxidando diretamente a molécula de DNA (Melvin *et al.*, 2001; Maheswari *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2016). Em alguns casos há também a participação de mecanismos mistos de clivagem (Peralta *et al.*, 2010). Por isso é necessário verificar o efeito que os



sequestradores de espécies reativas de oxigênio podem causar na atividade dos complexos, mesmo na ausência de co-reagentes, pois existem outros modos de geração de EROs.

Quando os ensaios de clivagem de DNA plasmidial foram realizados na presença de sequestradores de EROs, observou-se evidências que apontam um mecanismo hidrolítico de clivagem (Figuras 46 a 50), pois nenhum dos sequestradores foi capaz de inibir a clivagem de DNA mediada pelos complexos. Todos os resultados obtidos até aqui sugerem que os complexos de FeZn com alteração em sua segunda esfera de coordenação, embora sejam muito mais reativos que o complexo modelo FeZnOH (Peralta *et al.*, 2010), permaneceram com seu mecanismo de hidrólise de DNA inalterado. Este efeito é muito significativo, pois reforça a validade da proposta levantada por estes complexos: aumento da atividade sem que mecanismo seja afetado. Além disso, é possível afirmar também até o momento que o complexo FeCu-Lc, apesar de ter uma alteração no segundo metal do sítio ativo, não sofreu alterações quanto ao mecanismo de clivagem.

Estes resultados isolados não afirmam um mecanismo hidrolítico destes complexos, pois alguns complexos podem gerar EROs tão próximas ao DNA que a oxidação da molécula se dá antes mesmo da inativação destas espécies pelos sequestradores (Melvin *et al.*, 2001; Maheswari *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Isto estimula estudos subsequentes para confirmar os resultados encontrados, como o ensaio de clivagem na ausência de oxigênio em atmosfera de argônio.

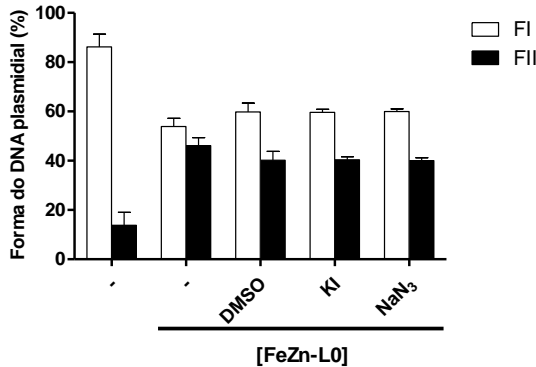


Figura 46. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L0, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hapes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

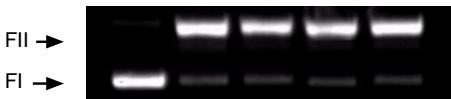
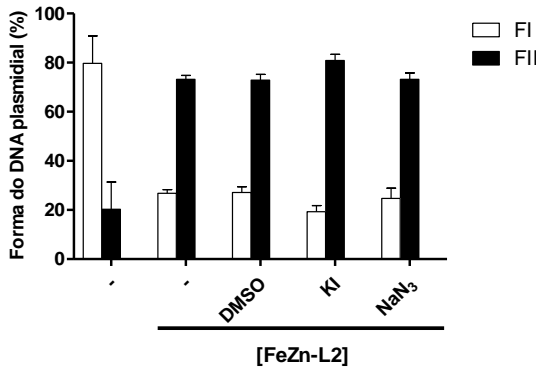


Figura 47. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L2, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hapes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

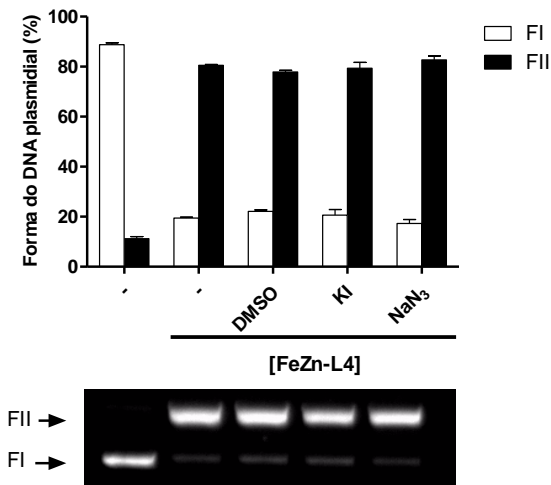


Figura 48. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L4, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

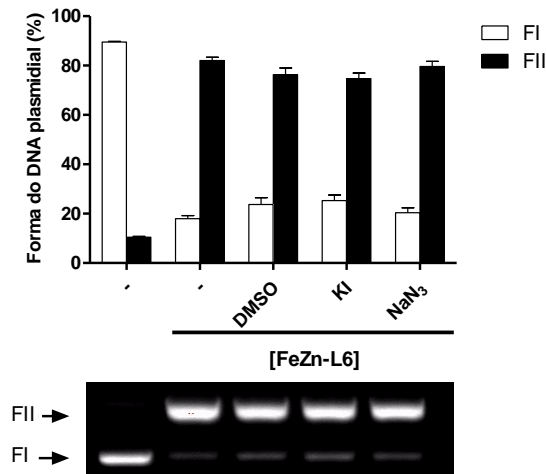


Figura 49. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZn-L6, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C;

Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

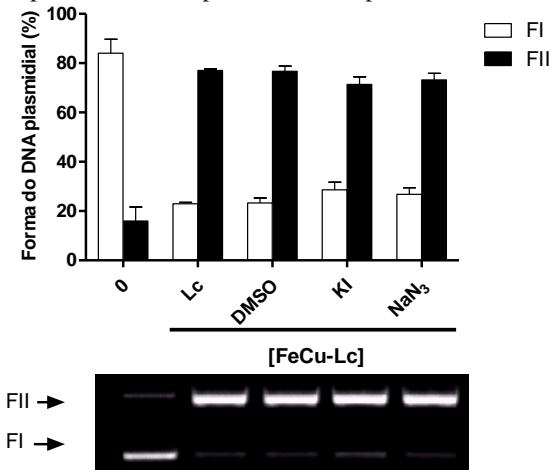


Figura 50. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeCu-L6, na presença dos diferentes sequestradores de EROs. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu$ M; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu$ M; [DMSO] = 0,4M; [KI] = 0,5M; [NaN<sub>3</sub>] = 0,5M; Temperatura = 50°C; Tempo = 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

### 4.3.3 Efeito da ausência de oxigênio

Como comentado anteriormente nos ensaios de sequestradores de espécies reativas de oxigênio, os complexos demonstraram um possível mecanismo hidrolítico, uma vez que sua atividade não foi alterada na presença dos diferentes sequestradores de diversas formas moleculares do oxigênio. Como também já mencionado, este ensaio não é o suficiente para afirmar a natureza do mecanismo de clivagem, sendo que existe a possibilidade do DNA sofrer a oxidação antes que o sequestro das espécies reativas ocorra, fazendo-se necessária a realização de um experimento em ausência de oxigênio para tal confirmação (Melvin *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2009). Dentro deste contexto foram realizados ensaios

de clivagem de DNA plasmidial em atmosfera de argônio com a concentração de  $5\mu\text{M}$  de complexo, a reação ocorreu por 2h a  $50^\circ\text{C}$  na ausência de oxigênio. O tempo de reação para este experimento foi reduzido para 2h com o intuito de diminuir a probabilidade de entrada de oxigênio no sistema. Paralelamente foi realizado um ensaio em condição aeróbia (na presença de oxigênio) utilizando como controle para para ambos os ensaios (aerobiose e anaerobiose) uma solução de Fe-EDTA/DTT, cujo o complexo formado a partir desta é capaz de gerar radicais hidroxila na presença de oxigênio através de reações de Fenton, que por sua vez são capazes de oxidar a molécula de DNA (Fenton, 1876; Netto *et al.*, 1996; Pogozelski e Tullius, 1998).

A Figura 51 apresenta a clivagem do DNA plasmidial na presença/ausência de oxigênio, sendo possível perceber através destes dados que a atividade dos complexos se mantém semelhante em ambos os cenários (aerobiose ou anaerobiose), o que concorda com os resultados já encontrados neste trabalho, principalmente com aqueles encontrados nos ensaios com sequestradores de EROs. É importante ressaltar também que a solução Fe-EDTA/DTT teve uma grande diferença em seu potencial de clivagem na presença e ausência de oxigênio, sendo esta maior em aerobiose, sugerindo que a reação em atmosfera de argônio teve realmente pouca ou nenhuma participação de oxigênio.

Estes resultados corroboram com alguns estudos já descritos na literatura, onde diversos autores também confirmam através de ensaio em atmosfera de argônio que não há oxigênio envolvido na clivagem do DNA plasmidial por complexos que também mimetizam o sítio ativo de fosfatases ácidas púrpuras (Liu *et al.*, 2002; Horn Jr *et al.*, 2005; Lanznaster *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2010). Além disso, os resultados

confirmam o mecanismo proposto por Peralta (2010) para complexos com o mesmo centro metálico (Fe e Zn) e com ligantes semelhantes, porém sem alterações na segunda esfera de coordenação (Peralta *et al.*, 2010). Outro resultado que chama atenção neste ensaio é que a substituição do íon Zn por Cu no complexo FeCu-Lc não alterou o mecanismo de clivagem deste complexo, o qual também apresentou um mecanismo hidrolítico. Este resultado foi similar ao apontado por Souza e colaboradores (2013), ao sugerirem um mecanismo hidrolítico para um complexo biomimético de fosfatase ácida púrpura com centro metálico  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  (Souza *et al.*, 2013).

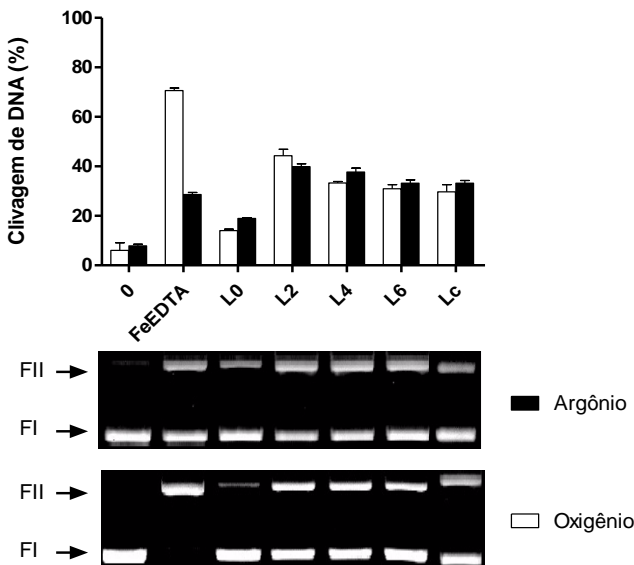


Figura 51. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZn-L0, FeZn-L2, FeZn-L4, FeZn-L6 e FeCu-Lc em aerobiose ou anaerobiose. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25 $\mu\text{M}$ ; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexos] = 5 $\mu\text{M}$ ; [FeEDTA] = 50 $\mu\text{M}$ ; Temperatura = 50 $^{\circ}\text{C}$ ; Tempo = 2h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

A confirmação do mecanismo hidrolítico destes complexos atrai grandes perspectivas quanto ao emprego destas moléculas como nucleases sintéticas ou até mesmo como precursoras de novos complexos metálicos. Por possuírem esta natureza hidrolítica, estas moléculas podem ser empregadas em diversas áreas da biologia molecular, por exemplo como enzimas de restrição, já que o mecanismo hidrolítico de clivagem é capaz de gerar extremidades do DNA que podem ser novamente religadas com a ação de enzimas ligases (Lanznaster *et al.*, 2005).

#### 4.4 CINÉTICA DE CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL

O perfil cinético de clivagem do DNA por diferentes concentrações dos complexos em estudo foi determinado através do desaparecimento da forma supernovelada (FI) do DNA plasmidial em função do tempo. Nestes ensaios as concentrações dos complexos foram de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 e 10 $\mu$ M. A concentração máxima de 10 $\mu$ M foi estabelecida pelo fato de as concentrações maiores apresentarem comportamentos não lineares de clivagem de DNA em função do tempo. Os tempos de reação foram de 1, 2, 4, 6 e 8h e a temperatura de reação de 50°C. Para cada concentração foi extraído um  $k_{obs}$  a partir da inclinação da reta originada do plote de  $\ln(FI)$  em função do tempo, quando  $R^2 > 0.95$ . As Figuras 52 a 56 mostram o plote de  $k_{obs}$  em função de cada concentração de complexo, tratando estes dados como uma cinética de pseudo-primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador em relação ao substrato (Sreedhara *et al.*, 2000).

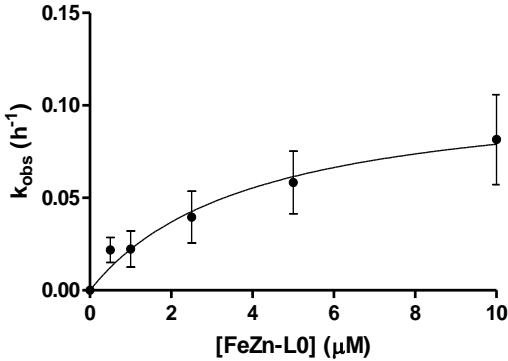


Figura 52. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeZn-L0, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10μM; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

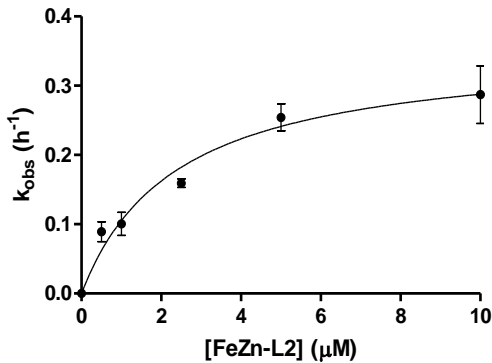


Figura 53. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeZn-L2, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10μM; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.



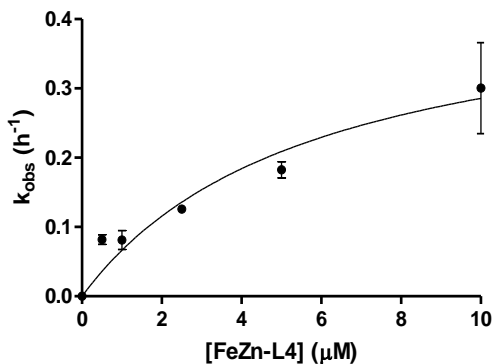


Figura 54. Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de complexo FeZn-L4, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu\text{M}$ ; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

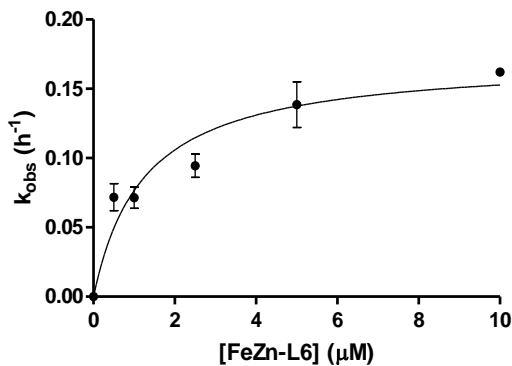


Figura 55. Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de complexo FeZn-L6, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng,  $\sim 25\mu\text{M}$ ; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10 $\mu\text{M}$ ; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

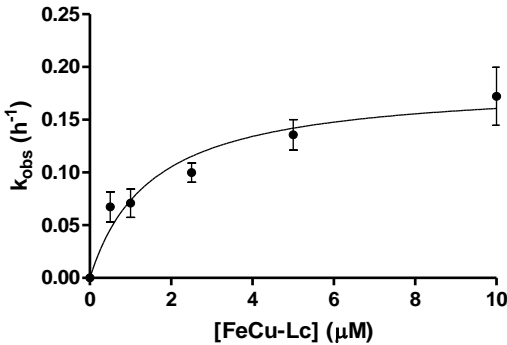


Figura 56. Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de complexo FeCu-Lc, mostrando o comportamento de saturação. Condições reacionais: [DNA] = 330ng, ~ 25μM; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0,5 - 10μM; Temperatura = 50°C; Tempo = 0 - 8h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Na Tabela 2 estão expostos os dados cinéticos de todos os complexos em estudo. Ao analisar os valores de eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) é possível perceber que o complexo com maior valor é aquele que se mostrou como mais ativo durante todos os experimentos anteriores (FeZn-L2). Embora sua constante catalítica ( $k_{cat}$ ) seja a segunda maior em comparação aos outros complexos, sua constante de afinidade ( $K_M$ ) é maior do que o complexo com maior  $k_{cat}$  (FeZn-L4) classificando assim o complexo FeZn-L2 com a maior eficiência catalítica. Os complexos FeZn-L6 e FeCu-Lc apresentaram valores similares de  $k_{cat}$  e de  $K_M$ , indicando que a alteração do segundo metal do sítio catalítico não alterou de modo expressivo as constantes cinéticas destes complexos.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem dos complexos FeZn-L0/L2/L4/L6 e FeCu-Lc. Constante catalítica ( $k_{cat}$ ), constante de afinidade ( $K_M$ ), eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ),  $k_{cat}/k_{unc}$ , e fator de incremento da atividade vs FeZn-L0 obtida com os complexos FeZn-L2/L4/L6 e FeCu-Lc pelos dados cinéticos de eficiência catalítica.

<b>Complexo</b>	$k_{cat}$ ( $h^{-1}$ )	$K_M$ ( $L mol^{-1}$ ) ( $\times 10^{-6}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $L mol^{-1} h^{-1}$ ) ( $\times 10^4$ )	$k_{cat}/k_{unc}^*$ ( $L mol^{-1}$ ) ( $\times 10^6$ )	$\frac{k_{cat}/K_M^{**}}{k_{cat}/K_M^{***}}$
<b>FeZn-L0</b>	0.1105	3.995	2.765	3.06	1
<b>FeZn-L2</b>	0.3565	2.391	14.91	9.90	5.5
<b>FeZn-L4</b>	0.4518	5.820	7.762	12.5	2.8
<b>FeZn-L6</b>	0.1718	1.245	13.79	4.77	5.0
<b>FeCu-Lc</b>	0.1851	1.519	12.18	5.14	4.4

-  $*k_{unc} = 3,6 \times 10^{-8} h^{-1}$ .

-  $**$ Complexo

-  $***$  FeZn-L0

- Condições reacionais: [DNA] = 330 ng; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 0,5 a 10  $\mu$ M; Temperatura = 50 °C; Tempo = até 8 horas.

O aumento da cadeia carbônica como alteração da segunda esfera de coordenação destes complexos a partir do complexo FeZn-L0 contribuiu para o aumento da atividade dos mesmos, embora a eficiência catalítica dos complexos não tenha aumentado de modo proporcional ao incremento do número de átomos de carbono contidos nesta cadeia, como mostrado na última coluna da Tabela 2. Este aumento de atividade não proporcional ao tamanho da cadeia carbônica também já havia sido relatado nos ensaios de efeito da concentração dos complexos (Item 4.1.1). Conforme apresentado na Tabela 2, a eficiência catalítica destes complexos seguiu a seguinte ordem de reatividade, considerando o

incremento da cadeia carbônica a partir do complexo FeZn-L0: FeZn-L2 > FeZn-L6 > FeCu-Lc > FeZn-4.

Alguns trabalhos com complexos que mimetizam o sítio ativo de fosfatases ácidas púrpuras apresentam alguns valores de constantes cinéticas semelhantes as encontradas neste trabalho, como por exemplo no trabalho de Peralta e colaboradores (2010) onde foram analisados complexos que também possuem os íons  $Fe^{III}Zn^{II}$  em seu centro metálico, e uma estrutura semelhante ao complexo FeZn-L0. Neste trabalho citado foram encontrados, para os complexos  $[Fe^{III}Zn^{II}(L-CH_3)]$ ;  $[Fe^{III}Zn^{II}(L-Br)]$  e  $[Fe^{III}Zn^{II}(L-H)]$ , os seguintes valores de  $K_M = 3.23 \times 10^{-3}$ ,  $3.66 \times 10^{-3}$  e  $3.73 \times 10^{-3}$  (mM) respectivamente (Peralta *et al.*, 2010), similar ao valor de  $3.99 \times 10^{-3}$  (mM) encontrado no presente trabalho para o complexo FeZn-L0 (Tabela 2). Os complexos que possuem a cadeia carbônica como uma alteração da segunda esfera de coordenação apresentaram, de um modo geral, uma eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) maior que aquela encontrada por Peralta e colaboradores (2010), sendo que o maior valor de eficiência encontrado pelo grupo foi de  $1.39 \times 10^4$  ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), enquanto neste estudo todos os complexos apresentaram valores maiores, inclusive o complexo FeZn-L0 que não possui a cadeia carbônica. É importante destacar dentro deste contexto, o complexo FeZn-L2 que apresentou uma eficiência catalítica de  $14.91 \times 10^4$  ( $\text{mol}^{-1} \text{ L h}^{-1}$ ), cerca de 10 vezes maior que os valores encontrados por Peralta e colaboradores (2010).

Ao analisar as constantes cinéticas encontradas por Souza e colaboradores (2013) para um outro complexo modelo de fosfatase ácida púrpura, porém com os íons  $Fe^{III}Cu^{II}$  como centro metálico, com um ligante semelhante ao complexo FeCu-Lc, foram encontrados valores de

$k_{\text{cat}}$  e  $K_M = 0.12 \text{ h}^{-1}$  e  $19.5 \mu\text{M}$  respectivamente. Os valores indicam uma menor eficiência deste complexo quando comparado ao complexo FeCu-Lc (Souza *et al.*, 2013). Portanto a eficiência catalítica do complexo FeCu-Lc é cerca de 20 vezes maior que aquela encontrada para o complexo estudado no trabalho de Souza e colaboradores (2013), variação essa que pode derivar de diferenças estruturais entre os mesmos, principalmente pela alteração na segunda esfera de coordenação do FeCu-Lc através da inserção da cadeia carbônica carregada positivamente. Como observado em ensaios anteriores, isto aumentou a interação deste com o DNA através de diferenças de carga.

Todos os complexos apresentaram uma maior afinidade ao DNA ( $K_M$ ) quando comparados a outros complexos que utilizaram ligantes semelhantes, mas sem a inserção das cadeias carbônicas (Camargo *et al.*, 2010; Peralta *et al.*, 2010; Camargo *et al.*, 2010d; Souza *et al.*, 2013), indicando que os complexos estudados no presente trabalho alcançam o objetivo que lhe foi pressuposto: o aumento da afinidade ao DNA através de alterações na segunda esfera de coordenação.

## 4.5 INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

### 4.5.1 Clivagem direta de oligonucleotídeos

Após a caracterização da atividade dos complexos quanto a clivagem de DNA plasmidial, foram realizados experimentos substituindo este pelo oligonucleotídeo ATCG, na busca da identificação de sequências específicas de interação dos complexos com o DNA. Este oligonucleotídeo possui uma sequência específica e uma estrutura conhecida, o que permite a análise de uma possível seletividade dos complexos em termo de estrutura/sequência nucleotídica. O fato de o

DNA plasmidial ser uma estrutura mais extensa e complexa para tal método, a substituição deste por esta estrutura menor como substrato é capaz de fornecer informações mais específicas quanto a seletividade do complexo, além de outros fatores de análise relevantes como o mecanismo de clivagem (oxidativo ou hidrolítico) que será discutido adiante.

Todos os cinco complexos foram submetidos à clivagem direta do oligonucleotídeo em diferentes concentrações (0 a 500 $\mu$ M) e condições de tempo (0 a 24h) e, mesmo com elevadas concentrações de complexo, a fragmentação do oligonucleotídeo não se mostrou efetiva o suficiente para identificação de sítios preferenciais de clivagem (Figuras 57 a 61). Nestas maiores concentrações, principalmente dos complexos FeZn-L2, FeZn-L4 e FeZn-L6, os poços apresentam uma diminuição da quantidade de oligonucleotídeo, sugerindo que os complexos apresentam clivagem do DNA, mesmo que de um modo indistinto. Alguns autores descrevem complexos metálicos que são capazes de clivar o DNA plasmidial com grande eficiência, mas que apresentam menor atividade de clivagem em moléculas menores e lineares como o oligonucleotídeo (Schnaith *et al.*, 1994; Mancin *et al.*, 2005; Liu e Sadler, 2011). Por razões estruturais o DNA plasmidial em sua forma superenovelada facilita a interação e aumenta atividade do complexo, enquanto formas lineares e curtas de DNA dificultam o processo de hidrólise

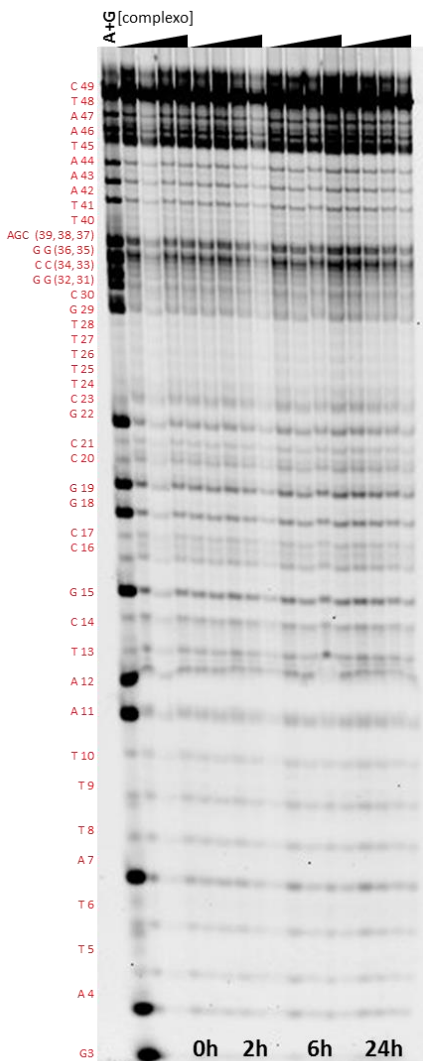


Figura 57. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L0. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

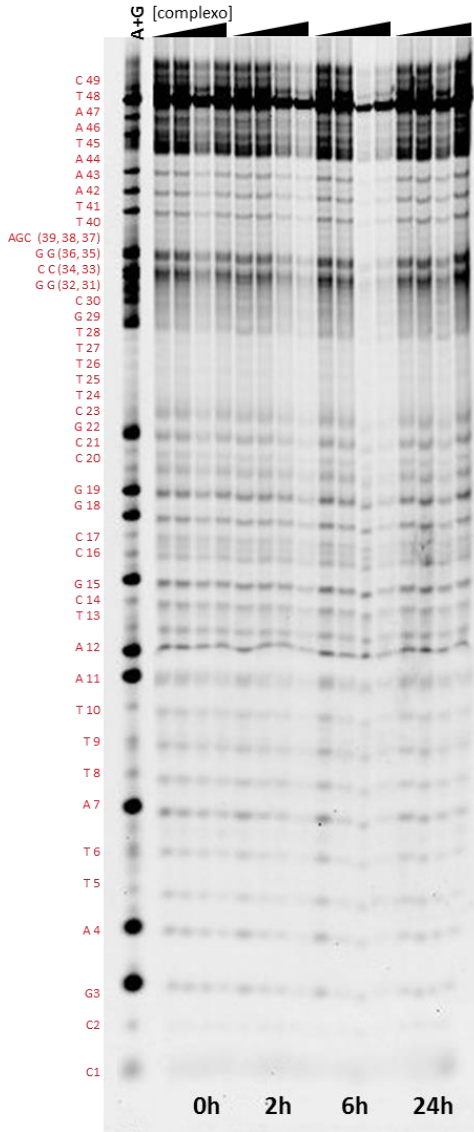


Figura 58. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L2. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.



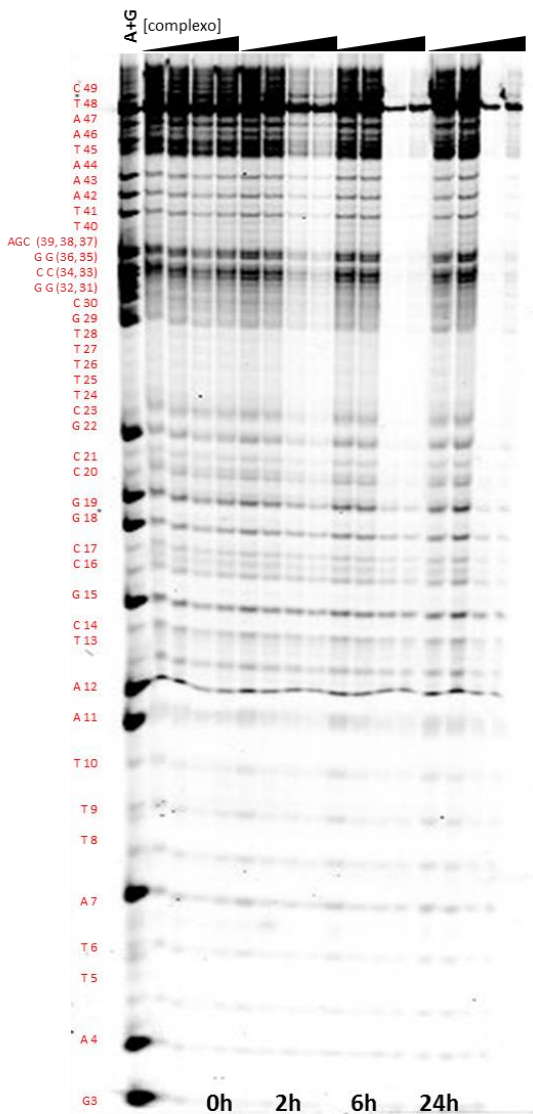


Figura 59. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L4. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

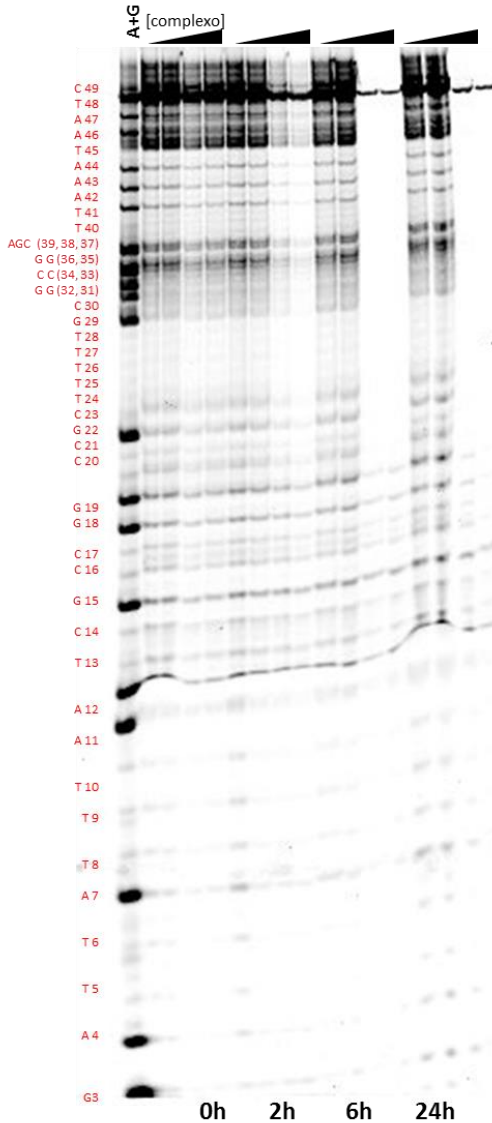


Figura 60. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L6. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

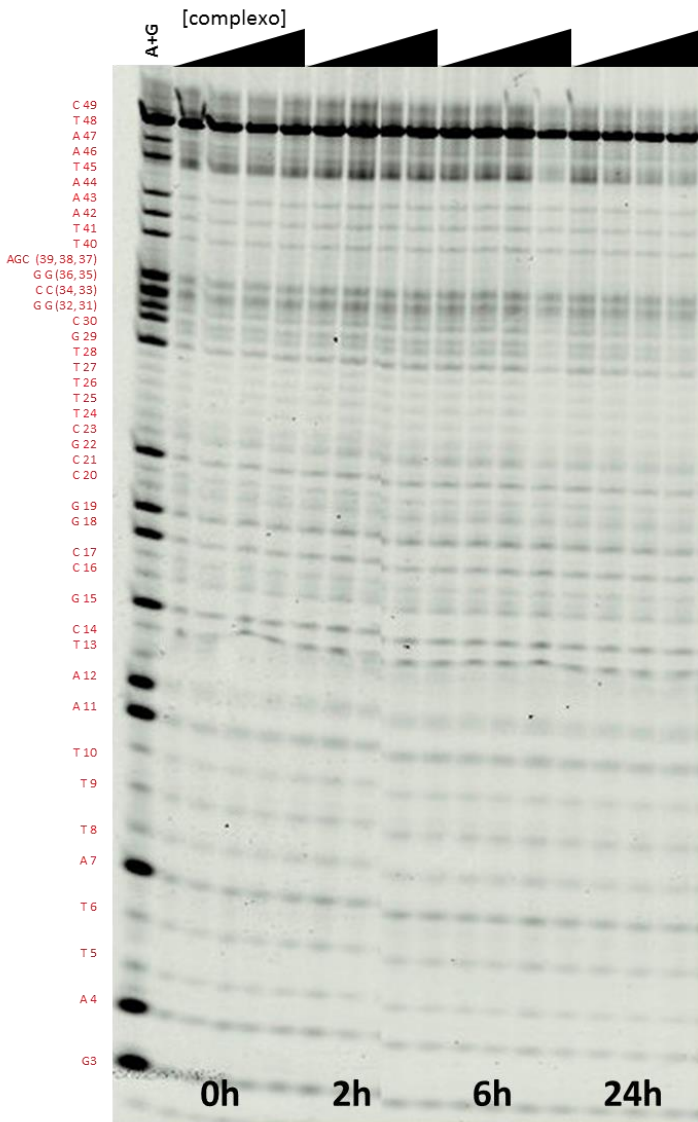


Figura 61. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeCu-Lc. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [com-plexo] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.5.2 Clivagem direta na presença de um agente redutor

Tendo em vista o resultado encontrado nos ensaios de clivagem direta, nos quais não foi observada fragmentação específica do oligonucleotídeo, outro teste foi realizado com a intenção de buscar uma visualização de especificidade de clivagem, realizando um ensaio de clivagem direta com o complexo que apresentou a maior atividade em DNA plasmidial (FeZn-L2) na presença do agente redutor ascorbato de sódio (50  $\mu$ M). Através deste experimento é possível induzir um mecanismo oxidativo neste complexo devido à redução do centro metálico pelo agente redutor induzindo a liberação de espécies reativas de oxigênio através de reações de Fenton conforme esquema 2 do item 4.3. Este artefato permite um incremento do potencial de clivagem de DNA pelos complexos, visando encontrar sítios específicos de oxidação que seriam próximos ao local onde o complexo estaria interagindo com a sonda (Raymond Y. N. Ho *et al.*, 1995).

A Figura 62 apresenta o resultado deste experimento, visualizando que o complexo na presença do ascorbato de sódio é capaz de clivar toda a sonda indistintamente de um modo diferente de quando este é desafiado a clivar o oligonucleotídeo sem a presença deste agente redutor. Esse aumento da clivagem em regiões não específicas pode afirmar que o complexo é capaz de interagir em vários locais da sonda, onde este libera espécies reativas de oxigênio em seu centro metálico e estas, por sua vez, oxidam a molécula de DNA em uma região próxima de onde ele se encontra.

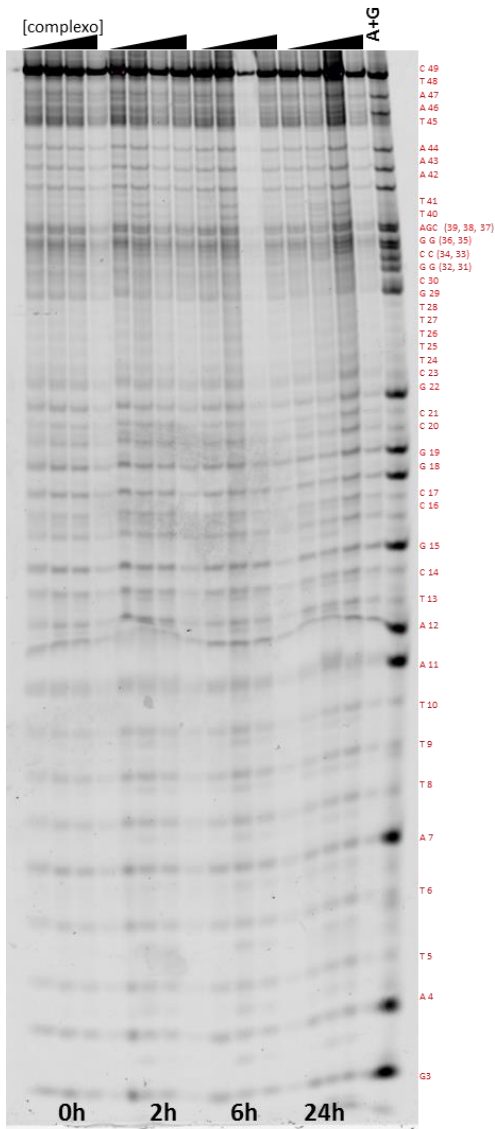


Figura 62. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L2 na presença de agente redutor. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500 $\mu$ M; [Ascorbato] = 50  $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

No gel apresentado na Figura 62 é perceptível a presença de bandas duplas (conforme destacado na Figura 63), sendo este um dado interessante quanto ao mecanismo de clivagem do complexo FeZn-L2 na presença do ascorbato. Esta segunda banda possui uma mobilidade eletroforética maior que aquelas bandas que coincidem com a do marcador A+G de Maxam e Gilbert, moléculas de oligonucleotídeo que foram tratadas com piperidina e geram extremidades 3'-fosfato (Maxam, 1977). Portanto, é possível afirmar que as bandas geradas pelo complexo na ausência do agente redutor, mesmo que com baixa intensidade de clivagem, apresentam uma mobilidade eletroforética semelhante ao marcador, inferindo assim que a clivagem do complexo sozinho também gera uma extremidade 3'-fosfato, o que já foi reportado por outros autores na literatura (Pitié *et al.*, 2000; Humphreys *et al.*, 2002; González-Álvarez *et al.*, 2005; Massoud *et al.*, 2014).

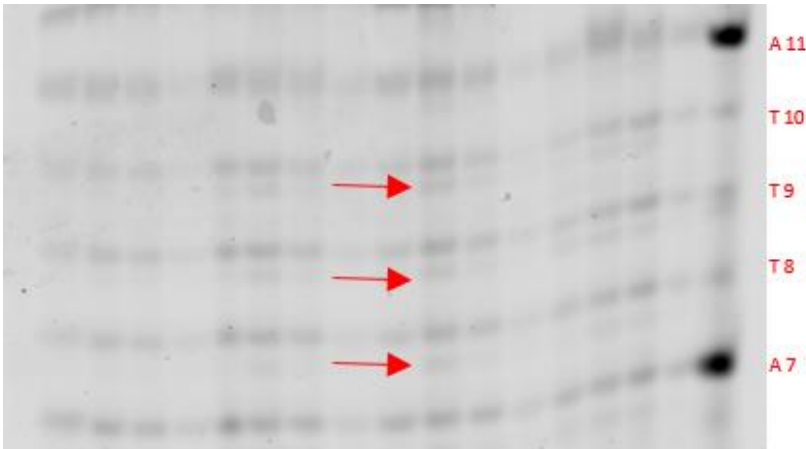


Figura 63. Clivagem do oligonucleotídeo ATCG pelo complexo FeZn-L2 na presença de agente redutor com destaque às regiões que apresentam bandas duplas como resultado de oxidação de nucleotídeos. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [Tampão] = Hepes (10mM, pH 7,0); [complexo] = 0 - 500µM; [Ascorbato] = 50 µM; Temperatura = 37°C; Tempo = 0 - 24h ao abrigo

de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Deste modo, as bandas de menor intensidade com uma mobilidade eletroforética levemente maior que aquelas com a extremidade 3'-fosfato correspondem ao mesmo fragmento, porém com uma outra extremidade, e não um fragmento diferente com um nucleotídeo a menos. Uma destas extremidades derivada como um produto de oxidação da desoxirribose do DNA é a 3'-fosfoglicolato (Figura 64) (Pogozelski e Tullius, 1998).

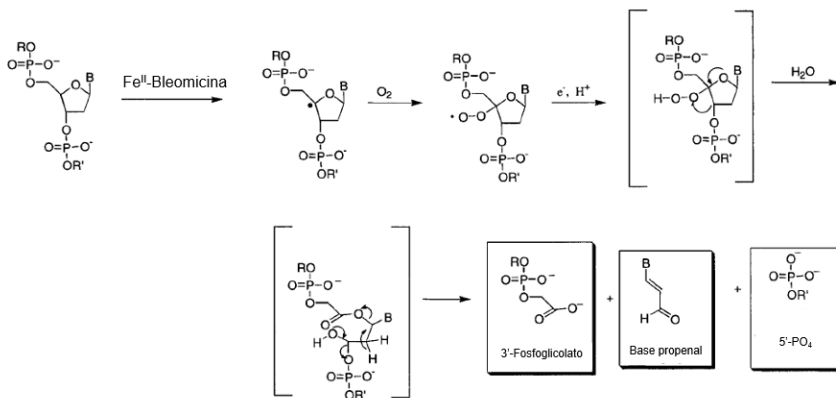


Figura 64. Esquema que representa a clivagem do DNA através do complexo Fe<sup>II</sup>-Bleomicina, mostrando a oxidação do C'4 da desoxirribose através de um rearranjo do radical peroxil ou peróxido formados pelo oxigênio molecular, resultando na clivagem do anel da desoxirribose e a abertura da pentose, gerando a fragmentação da molécula DNA liberando uma extremidade 5'-fosfato e uma 3'-fosfoglicolato, além da base-propenal (Pogozelski e Tullius, 1998).

Na Figura 64 é apresentado um esquema que representa a clivagem do DNA mediado pelo complexo Fe<sup>II</sup>-Bleomicina na presença de O<sub>2</sub>, gerando fragmentos com terminais 5'-fosfato, 3'-fosfoglicolato e também a base propenal, a qual é um produto exclusivo da oxidação do C'4 da pentose, sendo possível classificar este como um marcador

específico para o mecanismo de clivagem oxidativo (Pogozelski e Tullius, 1998; Chen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Angele-Martinez *et al.*, 2014). Neste trabalho não foi avaliado a geração deste produto, portanto não é possível afirmar que os fragmentos com maior mobilidade eletroforética presentes nas bandas duplas visíveis no gel de poliacrilamida são realmente resultados desta oxidação e caracterizados como 3'-fosfoglicolato. Porém, mesmo sem a confirmação da geração da base propenal é sugerido através deste experimento que o complexo FeZn-L2 na presença do agente redutor ascorbato de sódio é capaz de fragmentar o oligonucleotídeo indistintamente por um provável mecanismo oxidativo e gera extremidades 3'-fosfato e possíveis extremidades 3'-fosfoglicolato.

### 4.5.3 Footprinting de DNA por Fe-EDTA

Como não foi possível a visualização de sítios específicos de clivagem dos oligonucleotídeos pelos complexos em estudo, outra abordagem foi realizada com a intenção de identificar regiões de ligação/interação dos complexos com a molécula de DNA: o *footprinting* de DNA por Fe-EDTA. Esta técnica é utilizada com mais frequência para estudos de interação de pequenas moléculas orgânicas com o DNA (Bailly *et al.*, 2005; Jain e Tullius, 2008), porém alguns autores relatam o emprego desta técnica para determinar sítios específicos de interação de pequenas moléculas inorgânicas, como complexos metálicos, com o DNA (Kikuta *et al.*, 2002; Ruba *et al.*, 2004; Chvalova *et al.*, 2006).

Nesta técnica, inicialmente o complexo metálico irá se ligar ao oligonucleotídeo, e em seguida será adicionado à reação uma solução de Fe-EDTA que é capaz de oxidar a molécula do DNA, inclusive nas ligações fosfodiéster. Nos locais específicos onde o complexo está



interagindo com o DNA a oxidação pelo Fe-EDTA é dificultada, resultando em algumas “pegadas” no perfil de fragmentação relativo ao local onde o complexo estaria ligado ao oligonucleotídeo. Deste modo, esta reação foi realizada com todos os complexos em estudo e os resultados estão dispostos nas Figuras 65 e 66.

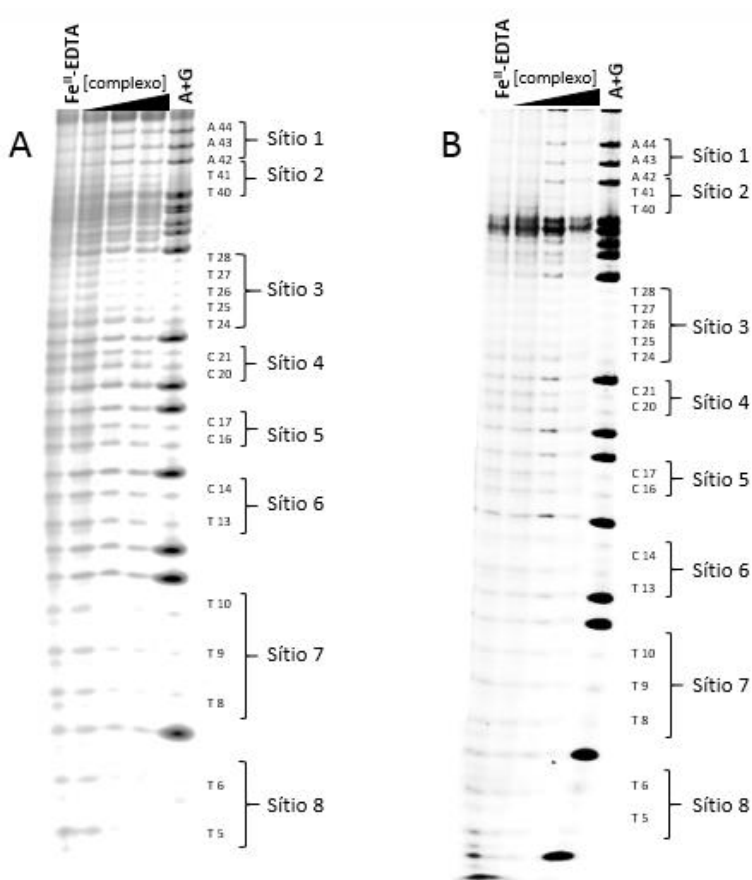


Figura 65. Footprinting por Fe-EDTA do oligonucleotídeo ATCG titulado com diferentes concentrações dos complexos FeZn-L0 (A) e FeZn-L2 (B). Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 90 segundos ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

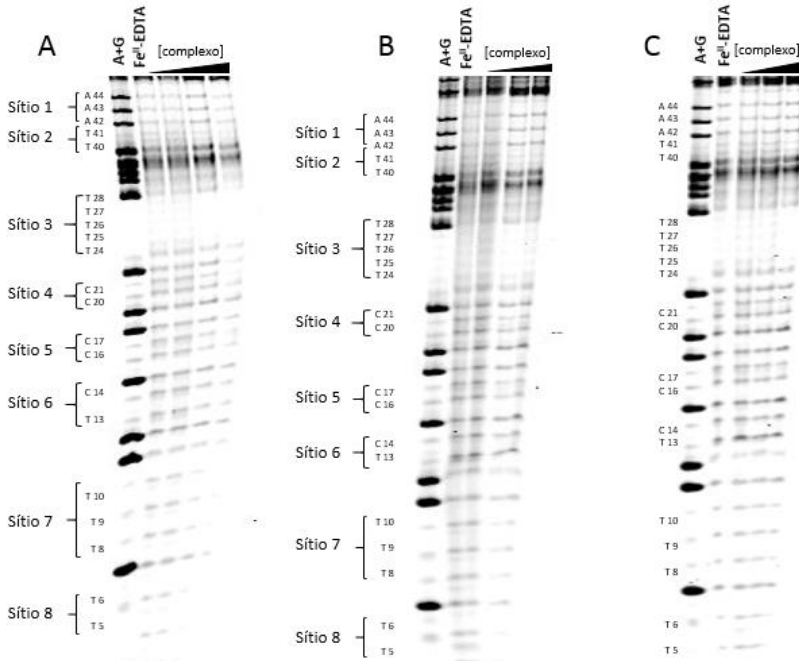


Figura 66. Footprinting por Fe-EDTA do oligonucleotídeo ATCG titulado com diferentes concentrações dos complexos FeZn-L4 (A) e FeZn-L6 (B) e FeCu-Lc (C). Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [Tampão] = HEPES (10mM, pH 7,0); [complexos] = 0 - 500 $\mu$ M; Temperatura = 37°C; Tempo = 90 segundos ao abrigo de luz. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Ao analisar os resultados do *footprinting* é possível perceber, em um primeiro momento, que o Fe-EDTA foi capaz de oxidar a molécula de oligonucleotídeo em toda a sua extensão, gerando diversos fragmentos como podem ser visualizados nas regiões referentes a esta reação em cada gel (poço 1 na Figura 65 e poço 2 na Figura 66). Essa oxidação é caracterizada principalmente pelo aparecimento das bandas duplas como resultado de oxidação, sendo o 3'-fosfoglicolato um possível fragmento gerado, como já comentado anteriormente. Ao adicionar concentrações crescentes de complexo nesta reação previamente à adição de Fe-EDTA,

é visível que esta molécula tem sua atividade de oxidação diminuída, isto fica claro quando em alguns poços com as maiores concentrações de complexo passam a apresentar buracos/pegadas no local onde antes, somente na presença do Fe-EDTA, havia clivagem do oligonucleotídeo. Além disso, também é possível perceber o desaparecimento da banda dupla de produto de oxidação na presença das concentrações maiores de complexo (50 e 500 $\mu$ M).

Os complexos com centro metálico FeZn apresentaram modos semelhantes de proteção do oligonucleotídeo. Em um primeiro momento não foi possível perceber uma proteção específica quanto à estrutura da sonda ou quanto as bases de DNA, já que os complexos aparentemente protegeram diversos pontos esparsos do oligonucleotídeo. Todos os complexos com centro FeZn apresentaram uma proteção das bases A 42-44 (Sítio 1). Esta proteção difere um pouco das demais que ocorreram neste experimento, pois as bandas referentes a estas bases ficaram mais nítidas na presença dos complexos, o que demonstra que o complexo permitiu uma diminuição da oxidação pelo Fe-EDTA, mas que de alguma forma influenciou na clivagem específica destas três bases. As bases T 40 e 41(Sítio 2) também sofreram uma proteção de todos os complexos de FeZn. A fita simples desta sonda, composta por bases Timinas 24-28 não pareadas, formando um *hairpin*, também apresentaram uma proteção por estes complexos, sendo visível este perfil nas concentrações de 50 e 500  $\mu$ M principalmente (Sítio 3). Todos os complexos FeZn apresentaram uma proteção das bases C e T que seguem na sequência após o *hairpin* (Sítios 4, 5, 6, 7 e 8), neste ponto parece haver uma preferência dos complexos por bases pirimídicas.

Os resultados deste experimento apontam para uma possível preferência de interação dos complexos por regiões que contêm bases pirimídicas, tendo em vista que estas foram as que apresentaram maior diminuição da clivagem por Fe-EDTA na presença dos complexos. Uma única região composta por purinas apresentou uma proteção (Sítio 1), porém esta localiza-se na fita oposta de uma região pirimídica que apresentou uma grande proteção (sítio 7), deste modo sugere-se que os complexos possam estar interagindo com a sequência T 8, 9 e 10 (sítio 7) e de algum modo atacando hidroliticamente as bases A 42, 43 e 44 (sítio 1) enquanto as protege da ação do Fe-EDTA, já que estas apresentam maior intensidade de suas bandas acompanhada de uma diminuição da ação do Fe-EDTA evidenciado pelo desaparecimento de bandas duplas e de fragmentação indiscriminada nesta região.

O complexo FeCu-Lc não apresentou uma visível diminuição de clivagem do oligonucleotídeo pelo Fe-EDTA, isto pode se dar por uma possível dificuldade que o complexo apresenta em interagir com a molécula. Alguns complexos já foram descritos na literatura como eficientes na interação e clivagem de DNA plasmidial, mas que ao ter sua atividade testada frente à uma molécula menor e mais linear, como o oligonucleotídeo utilizado neste trabalho, apresentam uma baixa afinidade pela molécula (Schnaith *et al.*, 1994; Mancin *et al.*, 2005). Na Figura 67 estão destacados os possíveis sítios de interação dos complexos com centro metálico FeZn neste oligonucleotídeo.





## 5 CONCLUSÕES

Os cinco complexos estudados neste trabalho foram capazes de clivar o DNA plasmidial de um modo concentração-dependente, sendo capazes de clivar uma das fitas desta molécula gerando até 90% de DNA circular aberto (FII). Os ensaios de concentração mostraram que todos os complexos com alteração em sua segunda esfera de coordenação apresentaram maior atividade que aquele que não possui essa alteração (FeZn-L0). A variação de pH alterou significativamente a atividade dos complexos, tanto para o complexo que contém o centro metálico Fe e Zn, quanto para o que contém Fe e Cu. Estas alterações de atividade concordam com a hidrólise do substrato artificial 2,4-BDNPP, sugerindo assim que o mecanismo de hidrólise deste éster modelo pode ser aplicado ao DNA. O perfil de sino apresentado pelo complexo com centro metálico Fe e Zn indica um possível mecanismo hidrolítico, similar ao complexo original FeZnOH.

Todos os complexos tiveram uma inibição de sua atividade na presença dos sais NaCl e LiClO<sub>4</sub>, indicando que a neutralização de cargas na molécula de DNA, favorecida pelos íons Na<sup>+</sup>, influencia no processo de catálise. Segundo o mecanismo proposto para a hidrólise do substrato modelo, a amina carregada positivamente na cadeia carbônica contribui significativamente para a estabilização da interação complexo-DNA. Isto explica como os íons Na<sup>+</sup> afetam o processo de catálise.

O complexo FeZn-L0 que não possui a cadeia carbônica como alteração na segunda esfera de coordenação apresentou uma diminuição de atividade de clivagem de DNA plasmidial na presença do ligante de sulco menor netropsina, indicando que este complexo possui uma preferência de interação ao DNA por este sulco. O complexo que possui

a cadeia com dois carbonos (FeZn-L2) apresentou uma diminuição da atividade de clivagem na presença de ambos os ligantes de sulco, sugerindo então que este complexo não possui preferência por um dos sulcos para ligação ao DNA, mas que necessita acessar o DNA por um destes para que a clivagem seja efetiva. Os complexos com cadeias carbônicas maiores FeZn-L4 e FeZn-L6 apresentam uma preferência de acesso ao DNA pelo sulco maior, uma vez que ambos apresentaram uma diminuição da atividade de clivagem na presença do ligante deste sulco. Por fim, o complexo FeCu-Lc não teve sua atividade influenciada pelos ligantes de sulco, indicando que este acessa o DNA por um outro mecanismo.

Todos os complexos foram capazes de interagir e alterar a estrutura secundária do CT-DNA, resultado observado nos ensaios de titulação de complexos ao CT-DNA acompanhado pela alteração no sinal de CD em espectroscopia de dicroísmo circular. Este experimento indicou que todos os complexos foram capazes de alterar a helicidade do DNA, bem como os empilhamentos de bases, caracterizados pela diminuição da intensidade do sinal de CD das bandas características de 275 e 245 nm do CT-DNA.

Nos ensaios de clivagem na presença dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio foi possível sugerir novamente um mecanismo hidrolítico para todos os complexos, já que nenhum dos sequestradores afetou significativamente o potencial de clivagem do DNA. No ensaio subsequente, de clivagem de DNA plasmidial na ausência de oxigênio em atmosfera de argônio, foi possível afirmar que não há influência de oxigênio molecular no processo de catálise já que todos os complexos mantiveram sua atividade de clivagem semelhantes



em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio). Estes resultados indicam que, apesar de os complexos serem muito mais reativos que o complexo FeZnOH, eles ainda mantêm o mecanismo hidrolítico de clivagem.

Os dados cinéticos encontrados neste trabalho para todos os complexos indicaram que as cadeias carbônicas adicionadas nos complexos aumentaram em até 5,5 vezes a eficiência catalítica destes quando comparados com o complexo FeZn-L0, que não possui alteração. De um modo geral estas modificações modularam a atividade catalítica e/ou aumentaram a afinidade do complexo pelo DNA, sendo que o complexo FeCu-Lc por exemplo apresentou uma atividade catalítica cerca de 20 vezes maior que um complexo semelhante reportado por Souza e colaboradores (2013). Nestes ensaios cinéticos foi perceptível que o complexo que se apresentou como mais ativo durante os ensaios anteriores (FeZn-L2), foi aquele que apresentou a melhor eficiência catalítica.

Por fim, nenhum dos complexos apresentou uma clivagem específica do oligonucleotídeo ATCG utilizado nos ensaios de clivagem direta e visualização em gel de alta resolução. Porém, no ensaio em que foi adicionado o agente redutor ascorbato de sódio à reação, o complexo FeZn-L2 foi capaz de oxidar o oligonucleotídeo quase que por completo, gerando inclusive bandas duplas que indicam um fragmento resultante da oxidação da pentose do nucleotídeo, possivelmente o 3'-fosfoglicolato. No ensaio posterior de *footprinting* por Fe-EDTA foi possível perceber que os complexos são capazes de interagir em quase toda extensão da molécula de nucleotídeo protegendo algumas bases nitrogenadas da oxidação pela solução de Fe-EDTA. Neste resultado chama-se a atenção

para uma possível preferência de proteção/interação nas bases pirimídicas.

Foi perceptível que as alterações na segunda esfera de coordenação destes complexos através da inserção de cadeias carbônicas com grupos amino é capaz de causar um incremento da atividade de complexos metálicos, bem como da afinidade destes pelo DNA, indicando que esta metodologia é capaz de potencializar a atividade de interação e clivagem de DNA por complexos metálicos.

## 6 PERSPECTIVAS

Em ensaios futuros pretende-se analisar a interação e a clivagem de outros oligonucleotídeos, com diferentes tamanhos e estruturas, como modo de buscar outras regiões que podem ser específicas para a ligação do complexo ao DNA. Além disso, pretende-se também, dentro deste contexto, realizar ensaios de *footprinting* utilizando outros agentes de clivagem de DNA diferentes do Fe-EDTA, como por exemplo as enzimas DNase I, exonuclease III, Benzonase, DNase II, que produzem padrões diferentes de fragmentação do DNA.

Pretende-se também determinar os sítios de clivagem destes complexos através de técnicas mais específicas e que forneçam informações mais detalhadas, como por exemplo através de espectrometria de massas por Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser, com detecção por tempo de voo (MALDIToF- MS, do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time of Flight Mass Spectrometry*).

Busca-se em trabalhos futuros ancorar a estes complexos sintéticos moléculas que tenham especificidade por regiões específicas do DNA, como um modo de utilizar esta segunda esfera de coordenação como um ponto de ancoramento para outras biomoléculas. Deste modo, seria possível modular a atividade destes complexos para uma catálise de DNA sítio-dirigida. Um exemplo de moléculas que podem ser empregadas dentro deste contexto para aumentar a seletividade dos complexos ao DNA são peptídeos que possuem afinidade ao DNA, como por exemplo aqueles que constituem o sítio de interação ao DNA de fatores de transcrição.



## REFERÊNCIAS

ALBERTS B, J. A., LEWIS J, ET AL. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science: 2002.

ALTMANN, R. Ueber Nucleinsäuren. **Offprint from Arch. Anat. Phys**, p. 524 - 536, 1889.

ANDERSON, T. R.; TOVERUD, S. U. Purification and characterization of purple acid phosphatase from developing rat bone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 247, n. 1, p. 131-139, 1986.

ANGELE-MARTINEZ, C.; GOODMAN, C.; BRUMAGHIM, J. Metal-mediated DNA damage and cell death: mechanisms, detection methods, and cellular consequences. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1358-1381, 2014.

ARMITAGE, B. Photocleavage of Nucleic Acids. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1171-1200, 1998.

ASATKAR, A. K. et al. Cu(I) complexes of bis(methyl)(thia/selena) salen ligands: Synthesis, characterization, redox behavior and DNA binding studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 18-24, 2017. ISSN 1386-1425.

AURAS, B. L. et al. meso-Mono-[4-(1,4,7-triazacyclononyl)]-tri(phenyl)porphyrin and the respective zinc(ii)-complex: complete characterization and biomolecules binding abilities. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 564-579, 2016.

AUSUBEL, F. M. B., R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology**. 1999.

BAILLY, C. et al. DNase I footprinting of small molecule binding sites on DNA. **Methods Mol Biol**, v. 288, p. 319-42, 2005.

BARTON, J. K. **Metal/Nucleic Acid Interactions**. University Press: Bioinorganic Chemistry, 1994.

BARTON, J. K. et al. Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 8, p. 2081-2088, 1986.

BASHKIN, J. K. Hydrolysis of phosphates, esters and related substrates by models of biological catalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 6, p. 752-758, 1999.

BECK, J. L. et al. Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 869, n. 1, p. 61-68, 1986.

BESSMAN MJ, K. A., LEHMAN IR, SIMMS ES. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. **Biochim Biophys Acta**, v. 21, p. 197-198, 1956.

BLACKBURN, G. M. **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. RSC Pub., 2006.

BORTOLOTTO, T. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos mononucleares de Cu(II) e binucleares de Fe(III)/Zn(II)**. 2015. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRESLAUER, K. J. et al. Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 8922-8926, 1987.

BROWN, R. Observations on the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. **Trans Linn Soc Lond**, v. 16, p. 685-746, 1833.

BUTENKO, N. et al. The effect of phosphate on the nuclease activity of vanadium compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 147, p. 165-176, 2015.

CAMARGO, M. A. et al. Efficient Phosphodiester Hydrolysis by Luminescent Terbium(III) and Europium(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 6013-6025, 2010.

\_\_\_\_\_. Efficient Phosphodiester Hydrolysis by Luminescent Terbium(III) and Europium(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 6013-6025, 2010b.

CAMARGO, M. A. et al. Synthesis, Structure, and Phosphatase-Like Activity of a New Trinuclear Gd Complex with the Unsymmetrical Ligand H3L As a Model for Nucleases. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3057-3063, 2010d.

CAMARGO, T. P. et al. Synthesis, characterization, hydrolase and catecholase activity of a dinuclear iron(III) complex: Catalytic promiscuity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 146, p. 77-88, 2015.

CAMARGO, T. P. D. **Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de FeIII/ZnII a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucleicos**. 2013. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CAMPBELL, H. D.; ZERNER, B. A low-molecular-weight acid phosphatase which contains iron. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 54, n. 4, p. 1498-1503, 1973.

CHAKRAVARTY, A. R. Photocleavage of DNA by copper(II) complexes. **Journal of Chemical Sciences**, v. 118, n. 6, p. 443-453, 2006.

CHARGAFF, E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. **Experientia**, v. 6, p. 201-209, 1950.

CHEN, B. et al. GC-MS methods to quantify the 2-deoxypentos-4-ulose and 3'-phosphoglycolate pathways of 4'-oxidation of 2-deoxyribose in DNA: Application to DNA damage produced by  $\gamma$ -radiation and bleomycin. **Chemical research in toxicology**, v. 20, n. 11, p. 1701-1708, 2007.

CHEN, T. T. et al. Purification and Properties of a Progesterone-induced Basic Glycoprotein from the Uterine Fluids of Pigs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 24, p. 8560-8566, 1973.

CHENNAM, K. P. et al. Synthesis, characterization, DNA interactions, DNA cleavage, radical scavenging activity, antibacterial, anti-proliferative and docking studies of new transition metal complexes. **Journal of Fluorescence**, v. 26, n. 1, p. 189-205, 2016.

CHITRAPRIYA, N. et al. Synthesis, DNA binding profile and DNA cleavage pathway of divalent metal complexes. **RSC Advances**, v. 5, n. 83, p. 68067-68075, 2015.

CHVALOVA, K. et al. Deoxyribonuclease I footprinting reveals different DNA binding modes of bifunctional platinum complexes. **Febs j**, v. 273, n. 15, p. 3467-78, 2006.

COTTON, F. A.; HAZEN, E. E.; LEGG, M. J. Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme—thymidine 3',5'-bisphosphate—calcium ion complex at 1.5-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 6, p. 2551-2555, 1979.

COWAN, J. A. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 634-642, 2001.

COWAN, J. A. Catalytic Metallodrugs. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, p. 1799-1810, 2008.

D'AURORA, V. S., A. M.; SIGMAN, D. S. Inhibition of E. coli DNA polymerase I by 1,10 phenanthroline. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 78, p. 170-176, 1977a.

\_\_\_\_\_. Phenanthroline-cuprous ion complex, a potent inhibitor of DNA and RNA polymerases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 80, p. 1025-1032, 1977b.

DEAL, K. A. H., A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 1713-1718, 1996.

DEHKORDI, M. E. A. Spectrophotometric Study on the Binding of Two Water Soluble Schiff Base Complexes of Mn (III) with ct-DNA. **Journal of Fluorescence**, v. 21, p. 1649-1658, 2011.

DEL SOLAR, G., ET AL. Replication and control of circular bacterial plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 434-464, 1998.



DERAKHSHANKHAH, H. E. A. Synthesis, cytotoxicity and spectroscopy studies of a new copper (II) complex: calf thymus DNA and T47D as targets. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 9, p. 737-746, 2012.

DOMINGOS, J. B. E. A. **A química dos ésteres de fosfato**. 2003.

DUPUREUR, C. M. Roles of metal ions in nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 250-255, 2008.

EFTHIMIADOU, E. K. et al. Metal complexes with the quinolone antibacterial agent N-propyl-norfloxacin: Synthesis, structure and bioactivity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 3, p. 525-535, 2007.

FENTON, H. J. H. On a New Reaction of Tartaric Acid (Letter to the editor). **Chemical News**, v. 33, p. 190, 1876.

FEULGEN, R. R., H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung vom Zellkern in mikroskopischen Präparaten. **Z. Phys. Chem.**, v. 135, p. 203 - 248, 1924.

FUNHOFF, E. G. et al. Substrate positioning by His92 is important in catalysis by purple acid phosphatase. **FEBS Journal**, v. 272, n. 12, p. 2968-2977, 2005.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. Oxidative nuclease activity of ferromagnetically coupled  $\mu$ -hydroxo- $\mu$ -propionato copper(II) complexes  $[\text{Cu}_3(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-propionato})_2]$  (L = N-(pyrid-2-ylmethyl)R-sulfonamidato, R = benzene, toluene, naphthalene). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 243-255, 2009.

GELLERT, M. E. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, p. 3872-3876, 1976.

GÓMEZ-GARCÍA, C. J. et al. Alternating Ferro/Antiferromagnetic Copper(II) Chain Containing an Unprecedented Triple Formato/Hydroxido/Sulfato Bridge. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 2664-2671, 2016.

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. et al. Biological Activity of Flavonoids Copper Complexes. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 631, p. 2181-2187, 2005.

GRAHAM, D. R. E. A. Cleavage of DNA by coordination complexes. Superoxide formation in the oxidation of 1,10-phenanthroline-cuprous complexes by oxygen - relevance to DNA-cleavage reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, p. 5419-5421, 1980.

GUO, F.; MARTI-RUJAS, J. Second sphere coordination of hybrid metal-organic materials: solid state reactivity. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 35, p. 13648-13662, 2016.

HALLIWELL, B. G., J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press: 2007.

HARTWIG, J. F. **Organotransition Metal Chemistry: from Bonding to Catalysis**. Sausalito, CA: 2010.

HEFLER, S. K.; AVERILL, B. A. The "manganese(III)-containing" purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 146, n. 3, p. 1173-1177, 1987.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds by a Macrocyclic Copper(II) Complex: Cu([9]aneN3)Cl<sub>2</sub> Hydrolyzes Both Dipeptides and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 26, p. 7015-7016, 1995.

HEGG, E. L. B., J. N. Hydrolysis of unactivated peptide bonds by a macrocyclic copper(II) complex: Cu([9]aneN3)Cl<sub>2</sub> hydrolyzes both dipeptides and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 7015-7016, 1995.

HORN JR, A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H<sub>2</sub>O/OH<sup>-</sup> groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 339-351, 2005.

HORTON, R., MORAN, L. A., SCRIMGEOUR, G., PERRY, M., AND RAWN, D. **Principles of Biochemistry**. 4th. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2006.

HUMPHREYS, K. J. et al. Oxidative strand scission of nucleic acids by a multinuclear copper(II) complex. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, p. 835-842, 2002.

JAIN, S. S.; TULLIUS, T. D. Footprinting protein-DNA complexes using the hydroxyl radical. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1092-1100, 2008.

JANA, N. C.; BRANDÃO, P.; PANJA, A. Tuning the geometry and biomimetic catalytic activity of manganese(III)-tetrabromocatecholate based robust platforms by introducing substitution at pyridine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 159, p. 96-106, 2016.

JEFF, V. J., A, STAMATOYANNOPOULOS. Genomic footprinting. **Nature Methods**, v. 13, p. 213-221, 2016.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 15-16, p. 1951-1972, 2007.

JIN, Y. et al. Influence of Stereochemistry and Redox Potentials on the Single- and Double-Strand DNA Cleavage Efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-His-Derived ATCUN Metallopeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 26, p. 8353-8361, 2007.

JOHNSON, W. C. **Determination of the Conformation of Nucleic Acids by Electronic CD**. 1996.

JOVITO, R. **Síntese, Caracterização e avaliação da promiscuidade catalítica de complexos binucleares bioinspirados**. 2010. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Tese de Doutorado em Química.

KIKUTA, E.; AOKI, S.; KIMURA, E. New potent agents binding to a poly(dT) sequence in double-stranded DNA: bis(Zn<sup>2+</sup>-cyclen) and tris(Zn<sup>2+</sup>-cyclen) complexes. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 473-482, 2002.

KIM, S. K.; NORDÉN, B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315, n. 1, p. 61-64, 1993.

KIMURA, S.; SAKAGUCHI, K. DNA Repair in Plants. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 753-766, 2006.

KRÄMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, n. 1, p. 243-261, 1999.

LANZMASTER, M. et al. A new heterobinuclear FeIII-CuII complex with a single terminal FeIII-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 319-332, 2005.

LEBANSKY, B. R.; MCKNIGHT, T. D.; GRIFFING, L. R. Purification and Characterization of a Secreted Purple Phosphatase from Soybean Suspension Cultures. **Plant Physiology**, v. 99, n. 2, p. 391-395, 1992.

LEVENE, P. A. PROPERTIES OF THE NUCLEOTIDES OBTAINED FROM YEAST NUCLEIC ACID. **Journal of Biological Chemistry**, v. 41, p. 483-493, 1920.

LEWIS, J. C. Artificial Metalloenzymes and Metallopeptide Catalysts for Organic Synthesis. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2954-2975, 2013.

LI, S. et al. DNA Cleavage and Condensation Activities of Mono- and Binuclear Hybrid Complexes and Regulation by Graphene Oxide. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 920, 2016.

LIN, M. F. et al. Purification and characterization of a new human prostatic acid phosphatase isoenzyme. **Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1055-1062, 1983.

LINDSTRÖM, B.; PETERSSON, L. J. A Brief History of Catalysis. **CATTECH**, v. 7, n. 4, p. 130-138, 2003.

LIU, C.; WANG, L. DNA hydrolytic cleavage catalyzed by synthetic multinuclear metallonucleases. **Dalton Transactions**, n. 2, p. 227-239, 2009.

LIU, C. et al. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p. 147-168, 2004.

LIU, C. et al. DNA Hydrolytic Cleavage by the Diiron(III) Complex Fe<sub>2</sub>(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)Cl(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: Comparison with Other Binuclear Transition Metal Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 913-922, 2002.

LIU, H.-K.; SADLER, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 5, p. 349-359, 2011.

LIU, Z.; SCHNEEBELI, S. T.; STODDART, J. F. Second-Sphere Coordination Revisited. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 315-320, // 2014.

LODISH H, B. A., ZIPURSKY SL. **Molecular Cell Biology**. 4th. New York: W. H. Freeman, 2000.

MAHESWARI, P. U. et al. Structure, Cytotoxicity, and DNA-Cleavage Properties of the Complex [CuII(pbt)Br<sub>2</sub>]. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3719-3727, 2008.

MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2540-2548, 2005.

MASH, H. E. et al. Complexation of Copper by Zwitterionic Aminosulfonic (Good) Buffers. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 671-677, 2003.

MASSOUD, S. S. et al. Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt(ii) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: synthesis, crystal structure and DNA cleavage. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 26, p. 10086-10103, 2014.

MAXAM, A. M. G., W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 560-564, 1977.

MELVIN, M. S. et al. Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrrolic natural products. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 87, n. 3, p. 129-135, 2001.

MIESCHER, F. In Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher – Aus dem Wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher., v. 1, p. 33 - 38, 1869.

MITIĆ, N. et al. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338-3363, 2006.

MORÁVEK, Z.; NEIDLE, S.; SCHNEIDER, B. Protein and drug interactions in the minor groove of DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 30, n. 5, p. 1182-1191, 2002.

NAKANISHI, K., BEROVA, N. AND WOODY, R. W. **Circular Dichroism - Principles and Applications**. 1999.

NELSON, D., L.; COX, M., M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São paulo: 2011.

NELSON, D., L.; COX, M., M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 2014.

NETTO, L. E. S. et al. Removal of Hydrogen Peroxide by Thiol-specific Antioxidant Enzyme (TSA) Is Involved with Its Antioxidant Properties: TSA POSSESSES THIOL PEROXIDASE ACTIVITY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15315-15321, 1996.

NEVES, A. et al. Catalytic promiscuity: catecholase-like activity and hydrolytic DNA cleavage promoted by a mixed-valence Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> complex. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1201-1212, 2010.

NEVES, A. et al. Fe<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup> Complexes as Synthetic Analogues for the Oxidized and Reduced Forms of Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 2360-2368, 1996.

NEVES, A. et al. An Unprecedented Fe<sup>III</sup>( $\mu$ -OH)Zn<sup>II</sup> Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486-7487, 2007.

NEWIE, J. et al. Kinetics of Bis-Allylic Hydroperoxide Synthesis in the Iron-Containing Lipoyxygenase 2 from Cyanospora and the Effects of Manganese Substitution. **Lipids**, v. 51, n. 3, p. 335-347, 2016.

NORDEN, B. T., F. Structure of methylene blue-DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy. **Biopolymers**, v. 21, p. 1713-1734, 1982.

OGUEY, C.; FOLOPPE, N.; HARTMANN, B. Understanding the Sequence-Dependence of DNA Groove Dimensions: Implications for DNA Interactions. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 15931, 2010.

OLIVEIRA, M. C. B. **Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA.** 2006. (Tese de doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. et al. Synthesis, Magnetostructural Correlation, and Catalytic Promiscuity of Unsymmetric Dinuclear Copper(II) Complexes: Models for Catechol Oxidases and Hydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 1569-1589, 2012.

PAGES, B. J. et al. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015.

PARODI, S. K., F.; NICOLINI, C. A clarification of the complex spectrum observed with the ultraviolet circular dichroism of ethidium bromide bound to DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 2, p. 477-486, 1975.

PATIL, S. A. et al. Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with coumarin-8-yl Schiff-bases: Spectroscopic, in vitro antimicrobial, DNA cleavage and fluorescence studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 5, p. 1128-1136, 2011.

PATRA, A. K. DNA cleavage in red light promoted by copper(II) complexes of  $\beta$ -amino acids and photoactive phenanthroline bases. **Dalton Transactions**, v. 48, p. 6966-6976, 2008 2007.

PATWARDHAN, A.; COWAN, J. A. Highly specific oxidative damage of double-strand DNA by copper aminoglycosides. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1490-1491, 2001.

PECCI, L.; MONTEFOSCHI, G.; CAVALLINI, D. Some New Details of the Copper-Hydrogen Peroxide Interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 235, n. 1, p. 264-267, 1997.

PERALTA, R. A. et al. Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of FeIII/ZnII Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421-11438, 2010.

PITIÉ, M.; BURROWS, C. J.; MEUNIER, B. Mechanisms of DNA cleavage by copper complexes of 3-Clip-Phen and of its conjugate with a distamycin analogue. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 4856-4864, 2000.

POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1089-1108, 1998.

RAGHEB, M. A.; ELDESOUKI, M. A.; MOHAMED, M. S. DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity studies of lomefloxacin and its transition metal complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 585-595, 2015.

RAMAN, N.; POTHIRAJ, K.; BASKARAN, T. DNA interaction, antimicrobial, electrochemical and spectroscopic studies of metal(II) complexes with tridentate heterocyclic Schiff base derived from 2'-methylacetoacetanilide. **Journal of Molecular Structure**, v. 1000, n. 1-3, p. 135-144, 2011.

RANGARAJAN, E. S.; SHANKAR, V. Sugar non-specific endonucleases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 5, p. 583-613, 2001.

RAYMOND Y. N. HO; JOEL. F. LIEBMAN; VALENTINE, J. S. **Active Oxygen in Biochemistry**. 1995.

RAZA, A. et al. Quercetin-Iron Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, DNA Cleavage, and Antibacterial Activity Studies. **Journal of Fluorescence**, p. 1-9, 2016.

REBILLY, J.-N. et al. Biomimetic cavity-based metal complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 2, p. 467-489, 2015.

REEDIJK, J. L., P. Cisplatin: Synthesis, antitumour activity and mechanism of action. **Pharmacy World & Science**, v. 7, p. 173-180, 1985.

ROBERTS, A. E.; SCHENK, G.; GAHAN, L. R. A Heterodinuclear FeIII ZnII Complex as a Mimic for Purple Acid Phosphatase with Site-Specific ZnII Binding. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 19, p. 3076-3086, 2015.



ROY, A. S. et al. DNA damaging, cell cytotoxicity and serum albumin binding efficacy of the rutin-Cu(ii) complex. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 5, p. 1687-1701, 2016.

RUBA, E.; HART, J. R.; BARTON, J. K. [Ru(bpy)<sub>2</sub>(L)]Cl<sub>2</sub>: luminescent metal complexes that bind DNA base mismatches. **Inorg Chem**, v. 43, n. 15, p. 4570-8, 2004.

SCHENK, G. et al. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 473-482, 2013.

SCHLACHER, K. et al. Roles of DNA Polymerase V and RecA Protein in SOS Damage-Induced Mutation. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 406-419, 2006.

SCHNAITH, L. M.; HANSON, R. S.; QUE, L. Double-stranded cleavage of pBR322 by a diiron complex via a "hydrolytic" mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 2, p. 569-573, 1994.

SCHWANN, T. S., HENRY; SCHLEIDEN, MATTHIAS;. **Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants**. London: The Sydenham Society, 1847.

SHAHABADI, N. H., L. Synthesis, characterization and multi-spectroscopic DNA interaction studies of a new platinum complex containing the drug metformin. . **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 377-385, 2014.

SHAW, W. J.; HELM, M. L.; DUBOIS, D. L. A modular, energy-based approach to the development of nickel containing molecular electrocatalysts for hydrogen production and oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1827, n. 8-9, p. 1123-1139, 2013.

SHOOK, R. L.; BOROVNIK, A. S. Role of the Secondary Coordination Sphere in Metal-Mediated Dioxygen Activation. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3646-3660, 2010.

SIGMAN, D., S; AND; CHEN, C., B. Chemical Nucleases: New Reagents in Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 207-236, 1990.

SIGMAN, D. S. et al. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 24, p. 12269-72, 1979.

SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical nucleases. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 6, p. 2295-2316, 1993.

SILVA, P. P. et al. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414-6424, 2011.

SOUZA, B. et al. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for FeIIIMII Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 3594-3596, 2013.

SOUZA, B. B., A. J.; BORTOLOTTI, T.; FISCHER, F.L.; TEREZI, H.; FERREIRA, D. E. C.; ROCHA, W. R.; NEVES, A. DNA photonuclease activity of four new copper(II) complexes under UV and red light: theoretical/experimental correlations with active species generation. **Dalton Transactions**, v. 39, p. 2027–2035, 2010.

SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient Inorganic Deoxyribonucleases. Greater than 50-Million-Fold Rate Enhancement in Enzyme-Like DNA Cleavage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 8814-8824, 2000.

SRISHAILAM, A. et al. Synthesis, characterization; DNA binding and antitumor activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 47-58, 2014.

TAN, J.; WANG, B.; ZHU, L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 727-739, 2009.

TAVAKOLYANPOUR, F. et al. Complexes of Co (II) and Cu (II) with nonsteroidal anticancer drug Letrozole and their interaction with DNA and BSA by spectroscopic methods and cytotoxic activity. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, n. 11, p. 2121-2133, 2016.

TERENZI, A. et al. Another step toward DNA selective targeting: NiII and CuII complexes of a Schiff base ligand able to bind gene promoter G-quadruplexes. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 18, p. 7758-7767, 2016.

TULLIUS, T. D. G., J. A. Mapping nucleic acid structure by hydroxyl radical cleavage. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 127-134, 2005.

URBACH, A. R.; WARING, M. J. Visualising DNA: Footprinting and 1-2D Gels. **Molecular BioSystems**, v. 1, n. 4, p. 287-293, 2005.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 5470-5474, 1982.

WANG, L.; LI, W.-J.; SONG, Y.-M. Antitumor activity and DNA binding studies on rare earth metal complexes with all-trans retinoic acid and L-glutamic acid. **RSC Advances**, v. 4, n. 80, p. 42285-42292, 2014.

WANG, Q. et al. Synthesis, characterization, DNA interaction, and antitumor activities of mixed-ligand metal complexes of kaempferol and 1,10-phenanthroline/2,2'-bipyridine. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 5, p. 2659-2666, 2014.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.

WEBER, N. D. et al. DNA cleavage enzymes for treatment of persistent viral infections: Recent advances and the pathway forward. **Virology**, v. 454-455, p. 353-361, 2014.

WENDE, C.; KULAK, N. Fluorophore ATCUN complexes: combining agent and probe for oxidative DNA cleavage. **Chemical Communications**, v. 51, n. 62, p. 12395-12398, 2015.

WIJSHAKE, T.; BAKER, D. J.; VAN DE SLUIS, B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1942-1950, 2014.

WILKINS, M., H, F;; RANDALL, J., T. Crystallinity in sperm heads: molecular structure of nucleoprotein in vivo. . **Medical Research Council Biophysics Research Unit, King's College**, v. 10, p. 192 - 193, 1952.

WITZ, G. S., A. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 2119-2133, 2010.

WONG-DEYRUP, S. W. et al. DNA targeting and cleavage by an engineered metalloprotein dimer. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 387-398, 2012.

XIAO, Y. et al. Synthesis, structure, and biological evaluation of a copper(ii) complex with fleroxacin and 1,10-phenanthroline. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 27, p. 10928-10935, 2016.

XIE, F. et al. One- and Two-Metal Ion Catalysis: Global Single-Turnover Kinetic Analysis of the PvuII Endonuclease Mechanism. **Biochemistry**, v. 47, n. 47, p. 12540-12550, 2008.

ZASTROW, M. L.; PECORARO, V. L. Designing Hydrolytic Zinc Metalloenzymes. **Biochemistry**, v. 53, n. 6, p. 957-978, 2014.

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007.

ZHANG, Q. et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling. **Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 7-15, 2011.

ZHAO, M. et al. Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 21, p. 8360-8375, 2013.