

Deise Juliane Mazera

***Estudo da atividade de degradação
de DNA por um complexo mononuclear
contendo a unidade estrutural cis-(H₂O)₂***

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Florianópolis – SC

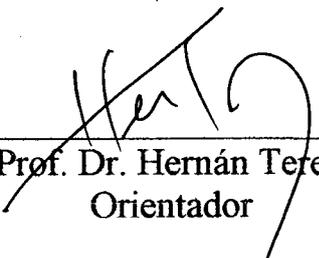
2002

ESTUDO DA ATIVIDADE DE DEGRADAÇÃO DE DNA POR UM
COMPLEXO MONONUCLEAR CONTENDO A UNIDADE
ESTRUTURAL CIS-(H₂O)₂

Dissertação apresentada por:

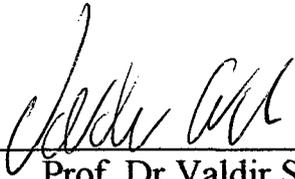
Deise Juliane Mazera.

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final para a obtenção do
título de Mestre em Química.



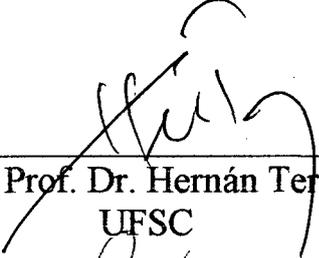
Prof. Dr. Hernán Terenzi
Orientador

Prof. Dr. Ademir Neves
Co-orientador



Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador do Curso

Banca examinadora:



Prof. Dr. Hernán Terenzi
UFSC

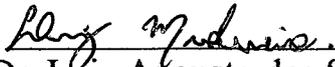
Prof. Dr. Ademir Neves
UFSC



Prof. Dr. Valdir Soldi
UFSC



Prof. Dr. Boris U. Stambuk
UFSC



Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
UFSC

*“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.
Esses que-fazeres se encontram um no corpo do outro.
Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando.
Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago.
Pesquisa para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo.
Pesquisa para conhecer o que ainda não conheço e comunicar
ou anunciar a novidade.”*

Paulo Freire

Agradecimentos

Durante a realização deste trabalho muitas pessoas contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Em especial dedico meus agradecimentos:

A Adriano, meu marido, pela alegria e amor indispensáveis durante esses meses de minha vida;

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi por sua excelente orientação e confiança dispensados no decorrer deste trabalho;

Ao meu irmão Édio Mazera pela disponibilidade e solicitude sempre presentes;

Aos amigos Patrícia, Rose e Maurício pelo companheirismo e por todas as informações científicas valiosas que muito me auxiliaram na realização deste;

Aos amigos da IC Guilherme, Eliana, Josiane, Fernanda pelo apoio e amizade construída;

Ao pessoal do laboratório de Bioinorgânica Dr Ademir Neves, Marciela, René, Alessandra e laboratório de Físico Química Orgânica Vanilde e Eduardo por muitas dicas e por possibilitarem o uso do espectrofotômetro e de reagentes de cromatografia;

Ao professor Doutor Valdir Soldi e esposa Marly pelas análises de DSC concedidas;

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da UFSC por possibilitar o meu aperfeiçoamento acadêmico;

A essas pessoas e muitas outras, aqui não citadas, que me auxiliaram e incentivaram na concretização desta importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
SIGLAS E ABREVIATURAS	IV
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DNA e Plasmídeos	1
1.2 Química Bioinorgânica	5
1.3 Compostos de coordenação como agentes medicinais em potencial	6
1.4 Nucleases Químicas	7
1.5 Clivagem Oxidativa de Ácidos Nucléicos	10
1.6 Clivagem Hidrolítica de ácidos nucleicos	14
1.7 Metalintercaladores	15
1.8 Fotoclivagem de Ácidos Nucléicos	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Materiais	20
3.1.1 CuMFF	21

3.2 Métodos	27
3.2.1 Eletroforese	27
3.2.2 Esterilização dos materiais	30
3.2.3 Obtenção dos plasmídeos	31
3.2.4 Quantificação e purificação dos plasmídeos	35
3.2.5 Clivagem de pSG-Nor-1 com CuMFF	36
3.2.6 Cinética de Clivagem de DNA plasmidial	38
3.2.7 Análise Espectrofotométrica	38
3.2.8 Localização do sítio de clivagem no DNA	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Dependência da clivagem de DNA com a temperatura	45
4.2 Dependência da clivagem de DNA com o pH	50
4.3 Dependência da clivagem de DNA com a força iônica	53
4.4 Efeito de captadores de Radicais Livres na clivagem de DNA	55
4.5 Espectrofotometria da interação DNA – CuMFF	59
4.6 Medidas Cinéticas da clivagem de DNA	60
4.7 Determinação do tipo de clivagem exibido por CuMFF	70
5 CONCLUSÕES	72
6 REFERÊNCIAS	73

Lista de Figuras

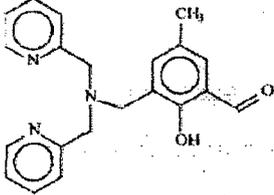
Figura 1 - Estrutura do DNA	3
Figura 2 – Micrografia eletrônica de DNA relaxado e superhelicoidizado negativamente	4
Figura 3 - Exemplos de algumas nucleases químicas	9
Figura 4 - Mecanismo de clivagem oxidativa mediada pelo complexo Cobre - 1,10-fenantrolina	12
Figura 5 - Representação estrutural dos terminais 3' hidroxil e 5' fosforilado ...	14
Figura 6 - Primeiros complexos octaédricos intercalantes	16
Figura 7 - Representação Esquemática de BMPAMFF.....	22
Figura 8 - ZORTEP do complexo CuMFF com estrutura A	23
Figura 9 - ZORTEP do complexo CuMFF com estrutura B	24
Figura 10 - titulação potenciométrica para o complexo CuMFF.....	26
Figura 11 - Estrutura Química da agarose e estrutura do polímero formado durante a gelificação	29

Figura 12 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 37 °C, pH 8,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF	46
Figura 13 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 50 °C, pH 8,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF	47
Figura 14 - Quantificação da foto representada na figura 12	48
Figura 15 - Quantificação da foto representada na figura 13	49
Figura 16 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 50 °C, pH 7,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF	51
Figura 17 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 50 °C, pH 9,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF	51
Figura 18 - Quantificação das fotos representadas na figura 13, 16 e 17	52
Figura 19 - Clivagem de pSG-Nor-1 a pH 8,0 e temperatura de 50 °C por 24 horas com CuMFF 1 mM à força iônica variável	53
Figura 20 - Quantificação da foto representada na figura 19	54
Figura 21- Clivagem de pSG-Nor-1 com e sem a adição de Glicerol e DMSO	56
Figura 22 - Quantificação das fotos representadas na figura 21 A	57
Figura 23 - Quantificação da foto representadas na figura 21B	58

Figura 24 - Espectro no UV-VIS de CuMFF (pH 8) com adição de pBSK-II	59
Figura 25 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 0,4 mM	61
Figura 26 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 0,7 mM	61
Figura 27 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 1,0 mM	62
Figura 28 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 1,5 mM	62
Figura 29 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 1,5 mM	63
Figura 30 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 2,0 mM	63
Figura 31 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 2,0 mM	64
Figura 32 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 2,5 mM	64
Figura 33 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 2,5 mM	65

Figura 34 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 2,8 mM	65
Figura 35 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 3,0 mM	66
Figura 36 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 à concentração de CuMFF igual a 3,0 mM	66
Figura 37 - \ln da intensidade da forma s no tempo t (S) dividido pela intensidade da forma s no tempo inicial (S_0) em função do tempo para várias concentrações de CuMFF.....	67
Figura 38 - Gel obtido para o sequenciamento de pSG-Nor-1 previamente tratado com CuMFF	71
Tabela 1 - Valores de kobs obtidos a partir da figura 37.....	68
Tabela 2 - Valores de kobs para vários complexos e enzimas.....	69

SIGLAS E ABREVIATURAS

CuMFF	$[\text{Cu} (\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]$
BMPAMFF (ligante)	
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
pSG-Nor-1	plasmídeo de 6,9 Kb
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
forma s ou I	forma plasmidial superenovelada
forma c ou II	forma plasmidial circular
MWM	marcador de peso molecular
kobs	constante de velocidade observada
pb	pares de bases
kb	Kilobases
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
G	Guanina
A	Adenina
T	Timina
C	Citosina

RESUMO

Neste trabalho analisou-se a atividade de clivagem do complexo metálico $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]$ (CuMFF) sobre o B-DNA dupla fita e circular. A clivagem do DNA mostrou-se ser dependente da temperatura, pH, força iônica e concentração deste complexo. O aumento da temperatura e concentração de CuMFF favorece a reação de clivagem enquanto um aumento de força iônica a desfavorece. A adição de captadores de radicais livres não alterou a fração de clivagem sobre o DNA exercida por CuMFF o que indica que possivelmente radicais livres difusos não estão envolvidos no processo de clivagem. Não houve alteração da banda a 408 nm exibida por CuMFF com a adição de DNA plasmidial o que nos leva a supor que CuMFF não é um complexo metálico que intercala na dupla hélice de DNA. Estudou-se a reação de clivagem usando-se excesso de CuMFF e então parâmetros cinéticos para a degradação do DNA foram estabelecidos. Os valores de K_{obs} obtidos estão na faixa de 0,00084 a 0,01301 min^{-1} para as concentrações de CuMFF variando de 1,0 a 3,0 mM. Nos experimentos de sequenciamento utilizando-se uma modificação do método de Sanger os resultados mostram que o plasmídeo não apresenta a formação de bandas de peso molecular específico devido ao tratamento com CuMFF o que nos leva a concluir que CuMFF não exibe um padrão de clivagem específico e que portanto este reage de forma aparentemente randômica sobre a dupla hélice de DNA.

ABSTRACT

In this work the cleavage activity of the metal complex [Cu(C₂₁H₂₁N₃O₂)(OH₂)₂] (CuMFF) on double strand closed circular B-DNA was evaluated. DNA cleavage activity was shown to be dependent on temperature, pH, salt ions and complex concentration. Increasing temperature and CuMFF concentration favors the cleavage activity, while increasing ion concentration inhibits this reaction. The addition of hydroxyl radical scavengers does not modify the cleavage profile, suggesting the absence of diffusible hydroxyl radicals mediating the cleavage reaction.

Spectrophotometric analysis performed on CuMFF – DNA interaction excludes the possibility of CuMFF intercalation on DNA by base stacking, since there is no modification on CuMFF characteristic absorbance at ~400nm followed by DNA addition to the spectrophotometer cell. The kinetic parameters of the cleavage reaction were studied under excess of each of the reagents (DNA or CuMFF). *K_{obs}* (initial velocity, pseudo-first order kinetic constant) values were obtained and range from 0.00084 to 0.01301 min⁻¹, with CuMFF concentrations from 1 to 3 mM. A modified dideoxy Sanger sequencing method was used to detect the site of DNA cleavage promoted by CuMFF. No specific site of cleavage was detected, thus CuMFF promotes a random cleavage pattern on plasmid DNA.

1 INTRODUÇÃO

Ácidos nucleicos criam difíceis e excitantes desafios para químicos e bioquímicos. Muitos aspectos da bioquímica dos ácidos nucleicos são amplamente apreciados pela comunidade científica, incluindo a natureza do código genético, a relação códon – anticódon entre mRNA e tRNA, a importância do dano causado ao DNA por radiações e a dificuldade no reparo do DNA.

O estudo das reações químicas do DNA e RNA, em uma perspectiva molecular altamente detalhada, tem sido facilitado com recentes avanços na síntese de ácidos nucleicos, técnicas analíticas, métodos computacionais e procedimentos em biologia molecular. Trabalhos na interface entre química de ácidos nucleicos e bioquímica datam de muitos anos e inclui pioneiros estudos de Dimroth, Eichhorn, Lippard, Sigman, Dervan e Barton.¹⁻⁶ As reações químicas focalizadas neste trabalho serão reações de clivagem que ocorrem no DNA por ataque de um complexo metálico, denominado Nuclease Química, sobre seu esqueleto fosfato.

1.1 Ácido Desoxiribonucleico (DNA) e plasmídeos

As moléculas de DNA são as mais longas nas células vivas. Uma célula de *Escherichia coli* contém uma molécula de DNA que, quando completamente estendida, seria cerca de 1000 vezes maior que o tamanho da célula. A molécula se ajusta dentro da célula porque ela se enrola de uma forma altamente compacta. Uma única molécula de DNA contém uma vasta livreria de informação genética, mas tem uma estrutura química relativamente simples.⁷

Uma molécula de DNA é composta por moléculas denominadas nucleotídeos. Cada nucleotídeo é constituído por três partes: uma molécula de

uma classe de composto nitrogenado, as bases nitrogenadas; uma molécula de pentose, a desoxirribose e um grupo fosfato.⁷

Quatro tipos de bases nitrogenadas ocorrem no DNA. Duas delas são adenina e guanina que são denominadas purinas. As outras duas são pirimidinas-citosina e timina. Assim, há quatro tipos de nucleotídeos no DNA, cada um apresentando uma base púrica ou pirimidica particular. Uma célula mantém ligados milhares de nucleotídeos para formar uma única fita de DNA. Cada fosfato está ligado a duas desoxiriboses, estas se alternam com os fosfatos para formar um esqueleto a partir do qual as purinas e pirimidinas se projetam. Duas fitas apresentam ligações cruzadas por meio das projeções das bases púricas e pirimidínicas formando uma fita dupla de DNA. Pontes de hidrogênio ligam as bases de uma cadeia com as bases de outra cadeia. Em uma fita dupla de DNA, as duas fitas não estão retas, mas sim enroladas em redor de cada uma para formar uma dupla hélice (figura 1).⁷

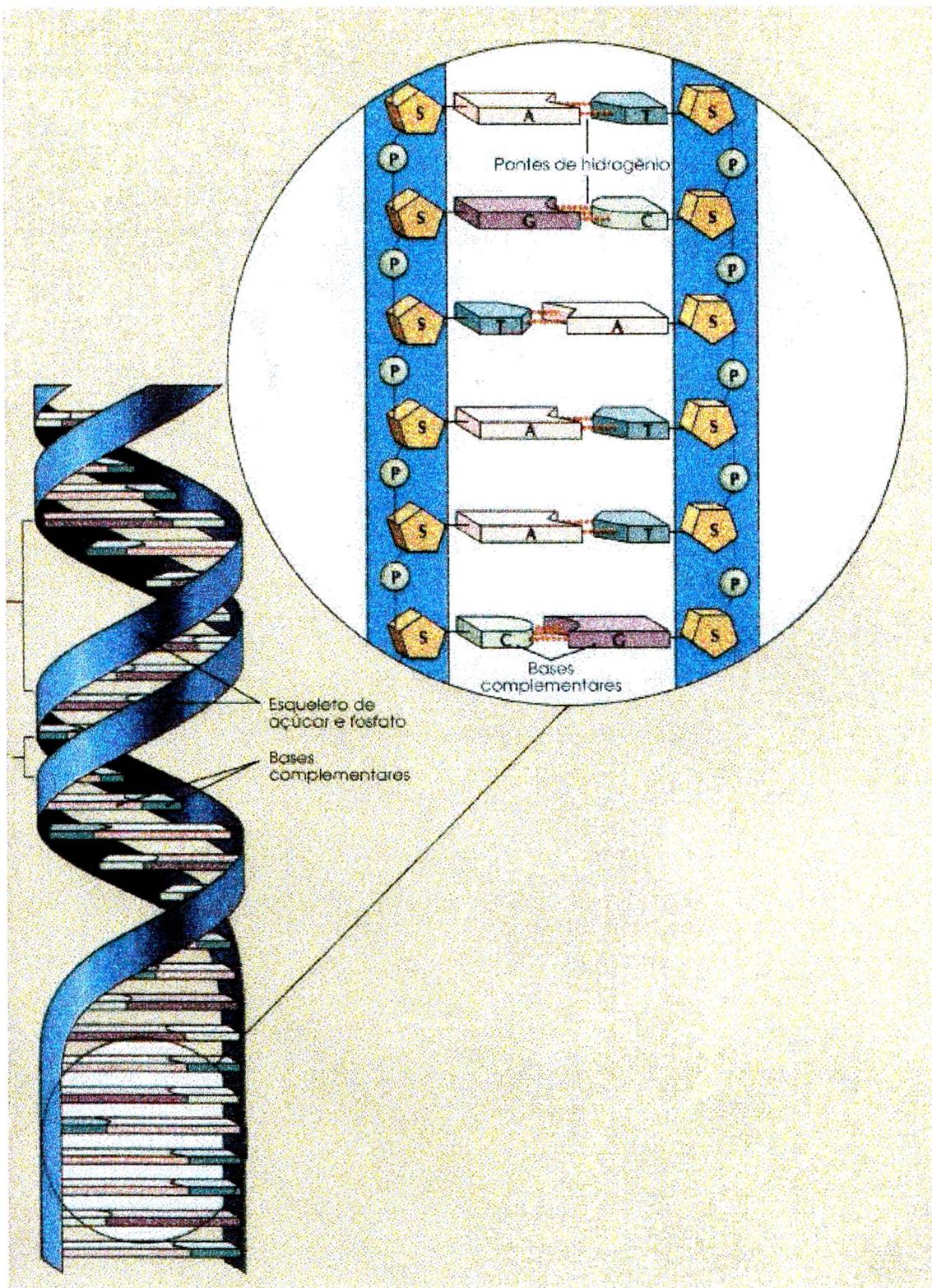


Figura 1 – Em uma dupla fita de DNA, as duas fitas enrolam-se entre si para formar uma dupla hélice e são mantidas ligadas por pontes de hidrogênio. P, fosfato; S, o açúcar desoxirribose.⁸

Além do cromossomo, uma célula bacteriana pode conter uma ou mais estruturas de DNA chamadas plasmídeos. Plasmídeos são moléculas de DNA de fita dupla menores que os cromossomos e que podem replicar-se independentemente do cromossomo. A maioria são moléculas de DNA circulares, mas plasmídeos lineares têm sido encontrados em algumas bactérias.⁷

Plasmídeos circulares podem apresentar-se em duas formas: superhelicoidizado e relaxado, que são topologicamente idênticos mas geometricamente diferentes (Figura 2).⁸



Figura 2 - Micrografia eletrônica de DNA relaxado e superhelicoidizado negativamente.⁸

A superhelicoidização altera acentuadamente a forma geral do DNA. Uma molécula de DNA superhelicoidizada é mais compacta que uma molécula de DNA relaxada do mesmo comprimento. Assim o DNA superhelicoidizado move-se mais rapidamente que o DNA relaxado quando eles são submetidos à eletroforese.⁸

Uma molécula de DNA plasmidial superenovelada submetida a um corte ou clivagem de seu esqueleto fosfato passará para a forma circular relaxada ou linear (neste caso deve haver cortes separados por poucos pares de bases em fitas adjacentes). Desta forma a distribuição observada de DNA plasmidial

superhelicoidizado e relaxado em géis de agarose fornece uma medida da extensão de clivagem.

1.2 Química Bioinorgânica

Muitos elementos metálicos desenvolvem um papel fundamental nos sistemas vivos. Uma característica dos metais é que eles facilmente perdem elétrons de seu estado elementar para formar íons positivamente carregados que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. E é nessa forma catiônica que os metais exercem suas funções biológicas. Enquanto íons metálicos são deficientes de elétrons, muitas moléculas biológicas como proteínas e o DNA são ricas em elétrons. A atração destas cargas opostas leva a uma tendência geral dos íons metálicos interagirem com moléculas biológicas. Este mesmo princípio rege a afinidade dos íons metálicos por pequenas moléculas e íons fundamentais em qualquer sistema vivo, como por exemplo o O_2 . Dada a grande variedade de interações metálicas na biologia, não é surpreendente que a evolução natural tenha incorporado muitos metais em suas funções biológicas. Metais exercem uma grande variedade de tarefas como o transporte de oxigênio e elétrons dentro de um sistema vivo.⁹

A Hemoglobina é uma proteína contendo o grupamento prostético HEMO no qual o átomo de ferro está coordenado a quatro nitrogênios no centro de um anel protoporfirínico podendo ainda formar duas ligações adicionais, e é esta unidade não peptídica que é responsável pelo transporte de oxigênio dentro de organismos vivos.⁸ Íons metálicos como Zinco fazem parte de temas estruturais tais como os “dedos de zinco” que estão contidos em proteínas de controle que regulam a transcrição ativando a expressão de genes dispersos⁸. Zinco é um componente natural da insulina, uma substância crucial para a regulação metabólica de açúcares. O magnésio atua na captação da energia solar através da

clorofila a que é um tetrapirrol substituído na qual os quatro átomos de nitrogênio dos pirróis estão coordenados ao átomo de magnésio⁸. Metais como cobre, zinco, ferro e manganês são incorporados em proteínas catalíticas (as metaloenzimas) que facilitam uma grande quantidade de reações químicas essenciais para a vida.⁹

1.3 Compostos de coordenação como agentes medicinais em potencial

Desde que a natureza tem feito extenso uso de íons metálicos em sistemas biológicos, a seguinte questão segue-se: “Podem os íons metálicos serem incorporados em drogas? São os compostos de coordenação agentes medicinais em potencial? Pode a química de coordenação ser usada para propósito medicinal? Esta área da ciência é atualmente denominada química inorgânica medicinal e ela tem existido como uma disciplina há cerca de somente trinta anos, desde a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, $\text{cis} [\text{Pt} (\text{NH}_3)_2 \text{Cl}_2]$. Todavia ela tem sido praticada há mais de 5000 anos¹⁰. Já há 3000 anos A.C. os egípcios usavam cobre para esterilizar água. Ouro foi usado em várias aplicações medicinais na Arábia e China há 3500 anos atrás muito mais pela sua preciosidade do que por uma verdadeira atividade medicinal. (Havia uma tendência, quando um precioso material era descoberto ou determinado ser de considerável valor, em acreditar que ele apresentaria benéficas influências sobre a saúde). Vários medicamentos a base de ferro foram usados no Egito a cerca de 1500 anos A.C. É nos últimos 100 anos, todavia, que a atividade medicinal de compostos inorgânicos tem sido desenvolvida de uma maneira racional, iniciando-se em meados de 1900 com a descoberta de $\text{K} [\text{Au} (\text{CN})_2]$ para a tuberculose e a atividade antibacterial de vários sais de ouro.¹¹

1.4 Nucleases Químicas

Uma das áreas em que químicos têm realizado contribuições fundamentais é no projeto e desenvolvimento de agentes químicos de clivagem de ácidos nucleicos - **nucleases químicas** – para o uso tanto como ferramentas em bioquímica e biologia molecular (como por exemplo sondas estruturais) quanto para a aplicação como agentes terapêuticos.^{12,13,14} Enzimas naturais têm sido extremamente utilizadas em muitas aplicações, porém seu grande tamanho e / ou faixa limitada de capacidade de reconhecimento de sequência, impede seu uso de uma maneira geral. Por exemplo, enzimas de restrição que são críticas na síntese de DNA recombinante, clivam o DNA em uma sequência específica de 4 a 8 pares de bases (pb) que são normalmente palindrômicas (isto é, a sequência é a mesma em ambas as fitas). Uma aplicação que demanda uma clivagem com um nível maior de seletividade (reconhecimento maior do que 8 pb) ou uma sequência não palindrômica requer um novo agente de clivagem com aspectos mais específicos de reconhecimento de sequência. Da mesma forma, experimentos de sondagem estrutural do RNA normalmente envolvem digestão parcial do substrato de RNA com uma série de ribonucleases que diferem em sua preferência quanto a sequência e estrutura secundária. Desenvolvimento de novos agentes de clivagem de RNA que clivem em qualquer região da simples fita, independentemente da sequência, poderiam simplificar enormemente esses experimentos.

Vários complexos de coordenação de metais como Cobre ^{15,16}, Ferro, Rutênio, Níquel,¹⁵ Eurôpio, uma série de Lantanídeos ^{17,18} e ainda compostos orgânicos, muitas vezes induzidos pela presença de um metal, como 2-nitrofenóis ¹⁹, interagem com ácidos nucleicos e podem apresentar aplicações terapêuticas. Essas interações podem levar a uma clivagem do esqueleto fosfodiéster dos ácidos nucleicos, nesse caso o complexo de coordenação é

denominado Nuclease Química, e/ou a uma “intercalação” do complexo de coordenação na estrutura do mesmo.

A cisplatina é um exemplo de complexo de coordenação que intercala no DNA modificando sua arquitetura através, principalmente, da formação de ligações cruzadas entre guaninas adjacentes de uma mesma fita, resultando em uma curvatura da hélice na direção do sulco maior do DNA.²⁰

Devido a estabilidade do esqueleto de fosfato e sua resistência à clivagem hidrolítica, vem sendo realizados esforços no sentido de desenvolver modelos funcionais de metaloenzimas hidrolíticas que reconheçam e clivem sequências ou estruturas específicas de ácidos nucleicos. Esta estabilidade tem sido sugerida como a razão pela qual ácidos nucleicos estão envolvidos no armazenamento da informação genética.²¹ O tempo de meia vida para a clivagem das ligações fosfodiéster no DNA é estimado na ordem de 200 milhões de anos (pH 7.0, 25°C). Todavia muitas DNases hidrolisam o DNA em poucos segundos. Parâmetros cinéticos para a clivagem de muitas nucleases químicas estão sendo constantemente reportados.^{22,23}

O uso de técnicas como espectrometria de massa e análises potenciométricas também têm sido utilizadas para o estudo da interação de complexos metálicos com ácidos nucleicos ou oligonucleotídeos.

O cobre-1,10-fenantrolina foi o primeiro complexo de coordenação sintético que demonstrou ter uma atividade nucleolítica eficiente. Outros exemplos de nucleases químicas são derivados Ferro-EDTA, várias metaloporfirinas e complexos octaédricos de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (fig. 3)¹⁵. Todos tendo um mecanismo de clivagem oxidativo.

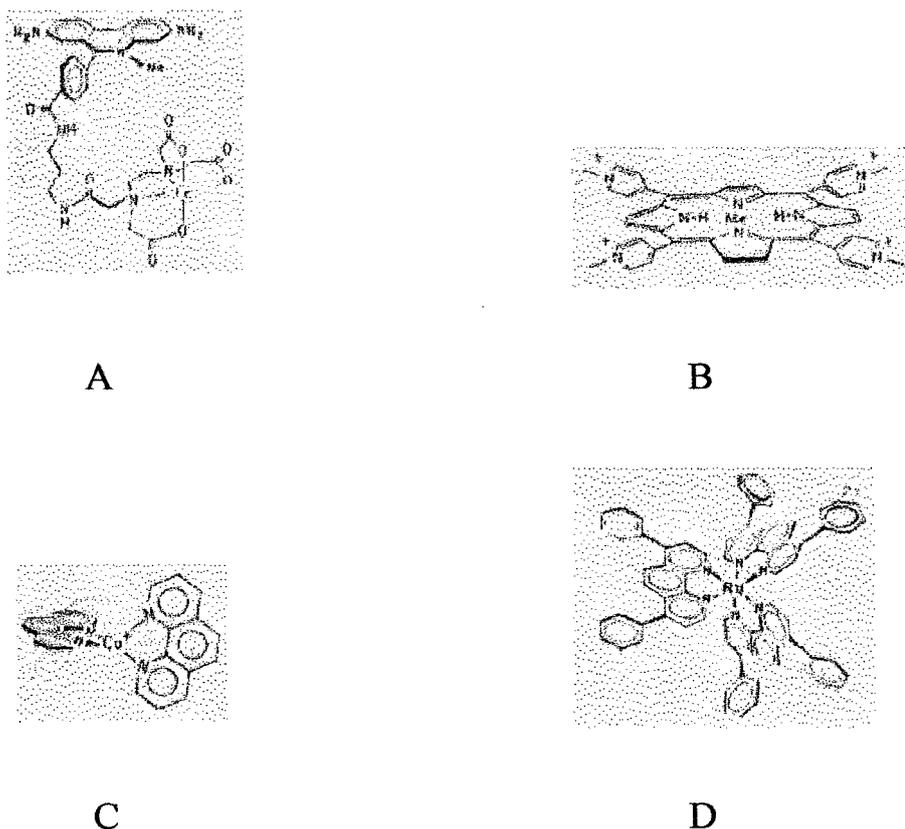


Figura 3 – Exemplos de algumas nucleases químicas ¹⁵. (A) Ferro-methidiumpropil-EDTA, (B) metaloporfirina, (C) 1:2 Cobre – 1,10- fenantrolina, (D) Tris(4,7 difenil-1,10 fenantrolina)Rutênio

Muitas nucleases como $[(en)_2Co(OH)(OH_2)]^{2+}$, $[(cyclen)Co(OH)(OH_2)]^{2+}$ e $[(tamen)Co(OH)(OH_2)]^{2+}$ exibem clivagens aleatórias sobre o esqueleto de fosfato dos ácidos nucleicos ²⁴, sendo sua atividade dificilmente predita. O uso de proteínas de ligação ao DNA para direcionar o modo de cisão, de Cobre-fenantrolina por exemplo, é interessante por dois aspectos. Primeiro, a especificidade da sequência de reconhecimento alcança tipicamente a faixa de 12 a 18 pares de bases. Segundo, os modos de cisão obtidos fornecem um teste

para os modelos de interação DNA-proteína propostos por cristalografia ou por “estudos de construção de modelos”.¹⁵

1.5 Clivagem Oxidativa de Ácidos Nucleicos

É bem sabido que danos ao DNA e RNA podem ser causados por radicais livres oxidantes. O grupo inclui certos antibióticos ativados, complexos metálicos, metaloenzimas com atividade redox, metabólitos de oxigênio e moléculas ionizadas por radiação de alta energia. Enquanto as bases heterocíclicas de ácidos nucleicos são importantes sítios de alterações mediadas por radicais livres²⁵, o esqueleto de açúcar fosfato é também altamente vulnerável a esse ataque. A abstração de um átomo de hidrogênio da ribose ou desoxiribose produz um radical açúcar que pode rearranjar, culminando na cisão da fita de ácido nucleico. Estas lesões, se não reparadas, podem contribuir para mutagêneses, carcinogêneses, envelhecimento e morte celular. O número de espécies químicas capazes de danificar os ácidos nucleicos é imensa e cobre uma larga faixa de moléculas. Todavia certos intermediários parecem ser comuns em muitos desses sistemas. Então a determinação de um caminho mecanístico tem ajudado a elucidar outros. Têm-se projetado novas moléculas com capacidade de clivagem, e é aparente que um melhor projeto é alcançado pela compreensão dos mecanismos de clivagem.²⁶

Os mecanismos de clivagem oxidativa são baseados na formação de radicais livres^{27,28}, levando a fragmentos com os terminais 3' e 5' fosforilados¹⁵ e que não podem ser enzimaticamente religados. A clivagem oxidativa inicia-se geralmente pela abstração de um átomo de hidrogênio do anel de desoxiribose, levando a formação de um radical açúcar que pode rearranjar culminando na cisão da dupla fita de DNA.²⁹ Na figura 4 observa-se o mecanismo oxidativo realizado por Cobre -1,10-fenantrolina¹⁵. Ele representa o mecanismo oxidativo

iniciado pela abstração do hidrogênio 1' mais bem caracterizado atualmente.²⁹ São formadas bases livres, iguais quantidades dos fragmentos 3' e 5' fosforilados e o produto metileno furanona.

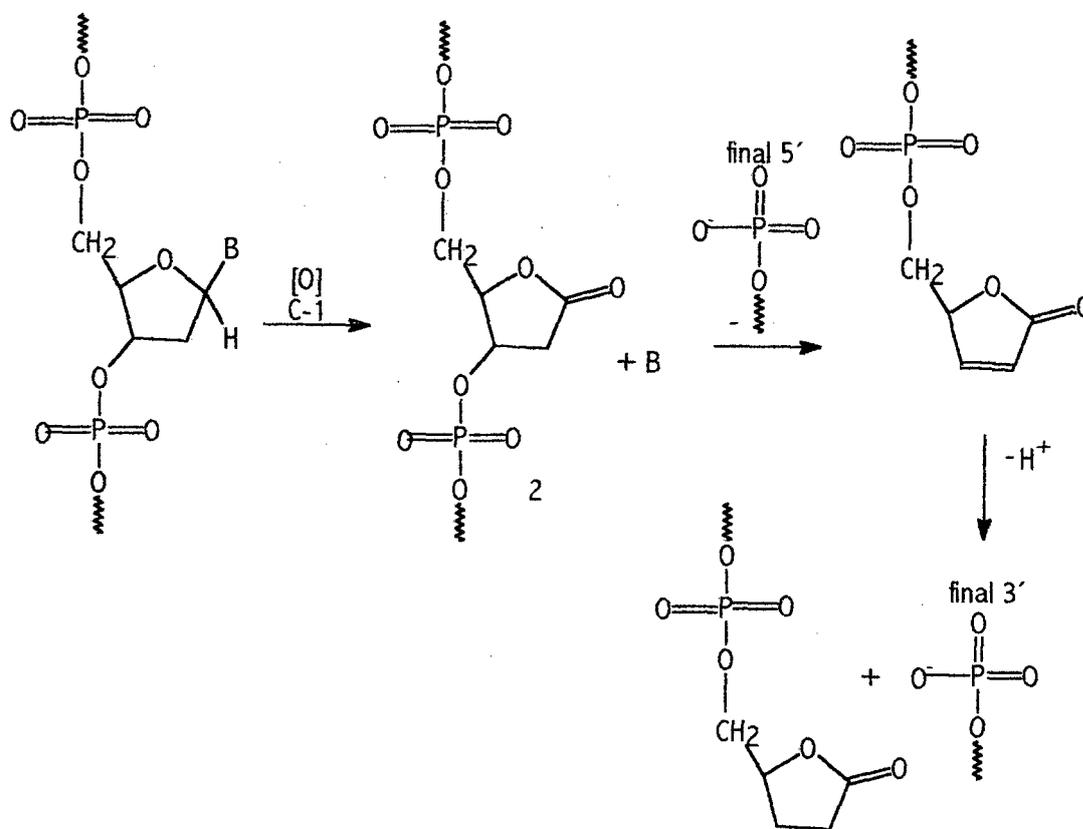


Figura 4 – Mecanismo de clivagem oxidativo mediado pelo complexo Cobre -1,10-fenantrolina ¹⁵

Um número de reagentes de clivagem oxidativa têm sido utilizados com grande sucesso em “DNA footprinting”³⁰, uma técnica na qual uma extremidade de um dos filamentos de um fragmento específico de DNA (produzida pela ação de uma enzima de restrição, por exemplo) é inicialmente marcada com ³²P. Uma proteína de ligação específica é adicionada ao DNA marcado, e o complexo é digerido com uma nuclease química ou enzimática por tempo suficiente para que ocorra em média um corte em cada cadeia. Uma alíquota sem a proteína de ligação específica é tratada do mesmo modo para servir como controle. Os fragmentos de DNA resultantes são separados de acordo com o tamanho por eletroforese. O padrão de gel é altamente revelador: uma série de faixas presentes na amostra controle está ausente da alíquota contendo a proteína de ligação. Estas faixas estão ausentes porque a proteína protege o DNA de clivagens que iriam originar os fragmentos correspondentes.⁸

Nesta técnica as nucleases químicas suplementam os reagentes de modificação química específicos para bases (por exemplo dimetil sulfato) e as nucleases enzimáticas como a Dnase I. “Footprinting” utilizando Dnase I é um método seguro para definir seqüências específicas de contato entre proteínas e DNA . A atividade de nuclease química de Ferro-EDTA possui duas vantagens relativamente à DNase I como reagente de “Footprinting”. Primeiro seu modo de clivagem não é muito dependente da seqüência. Por exemplo, se a DNase I possui poucos sítios de clivagem na região de uma seqüência de reconhecimento de uma proteína, a proteção é dificilmente avaliada. Segundo, seu pequeno tamanho permite clivagens mais delimitadas na seqüência de DNA protegida pela proteína de ligação e portanto uma definição mais precisa da mesma.³¹

A aplicação de nucleases que agem pelo processo oxidativo como agentes quimioterapêuticos é limitada pois esses reagentes requerem ativação por luz ou um oxidante.^{28,32}

1.6 Clivagem Hidrolítica de ácidos nucleicos

Íons metálicos são cofatores essenciais nas reações de muitas nucleases porém, o papel preciso do íon metálico no mecanismo hidrolítico é desconhecido. Há vários aspectos no mecanismo de reações de hidrólise de fosfato diéster promovida por metais lábeis que permanecem desconhecidos, incluindo a origem do nucleófilo e o tipo de intermediário ou estrutura do estado de transição.³³

Sabe-se que a clivagem hidrolítica realizada por nucleases químicas envolve a formação dos fragmentos 3' hidroxil e 5' fosforilado (figura 5) que podem ser enzimaticamente religados e que são consistentes com àqueles produzidos por hidrolases naturais. Este modo de clivagem é frequentemente reportado em DNA³⁴, RNA³⁵ e ainda utilizando complexos de lantanídeos.³⁶

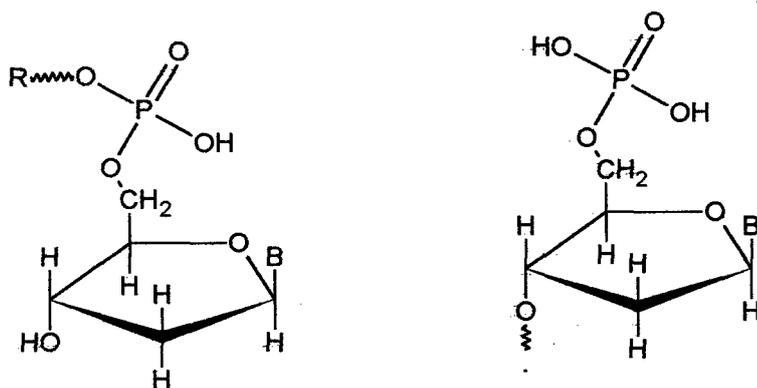


Figura 5 – Representação estrutural dos terminais 3' hidroxil e 5' fosforilado

Para a hidrólise do diéster de fosfato promovida por Ir (III) identificou-se claramente o nucleófilo. Foi mostrado que esta hidrólise ocorre via um ataque

intramolecular no centro de fósforo pelo hidróxido coordenado ao metal. Um mecanismo similar foi proposto para a hidrólise de fosfato diéster promovida por complexos metálicos lábeis. Através de um ataque intramolecular, no mecanismo hipotético mais comum, é possível que o hidróxido coordenado ao metal agiria como uma base geral para ativar uma molécula de água do solvente a atacar o centro de fósforo.³³

1.7 Metalintercaladores

Intercaladores são pequenas moléculas contendo um heterociclo, aromático e planar que pode se inserir e “ancorar-se” entre os pares de bases da dupla hélice de DNA.³⁷

Metalintercaladores sintéticos tem sido preparados para uma diversidade de funções como investigações de fluorescência do DNA, sondagens estruturais do RNA ou ainda reagentes fotoquímicos para o reparo de dímeros de timina. Complexos têm sido sintetizados para sondar uma diversidade de sítios sobre a dupla hélice de DNA.³⁸ Todavia, muito trabalho é necessário ser feito para o desenvolvimento do potencial terapêutico destes complexos. Metalintercaladores estão entre poucos complexos sintéticos que têm como alvo, especificamente, o sulco maior do DNA, e tem-se observado que essa especificidade pode levar a seletiva inibição de proteínas de ligação ao DNA.³⁸

Os primeiros experimentos que descreveram a interação de complexos de metais de transição octaédricos com o DNA envolveram o uso de complexos já bem caracterizados em muitos outros contextos. Estes estudos iniciais focalizaram na ligação de complexos de zinco, cobalto e rutênio, com o ligante tris (fenantrolina), sobre o DNA^{39,40} (Figura 6). Com base em estudos de RMN e fotofísicos foi proposto que o complexo catiônico tris (fenantrolina) ligava-se ao DNA através de três modos não covalentes: (i) eletrostaticamente (ii)

hidrofobicamente junto ao sulco menor; e (iii) parcial intercalação de um dos ligantes fenantrolina inserindo-se nas bases do DNA do lado do sulco maior. Preferências enantioméricas também têm sido debatidas sendo que a discriminação quiral claramente depende da união da simetria do complexo metálico com aquela da dupla hélice.³⁸

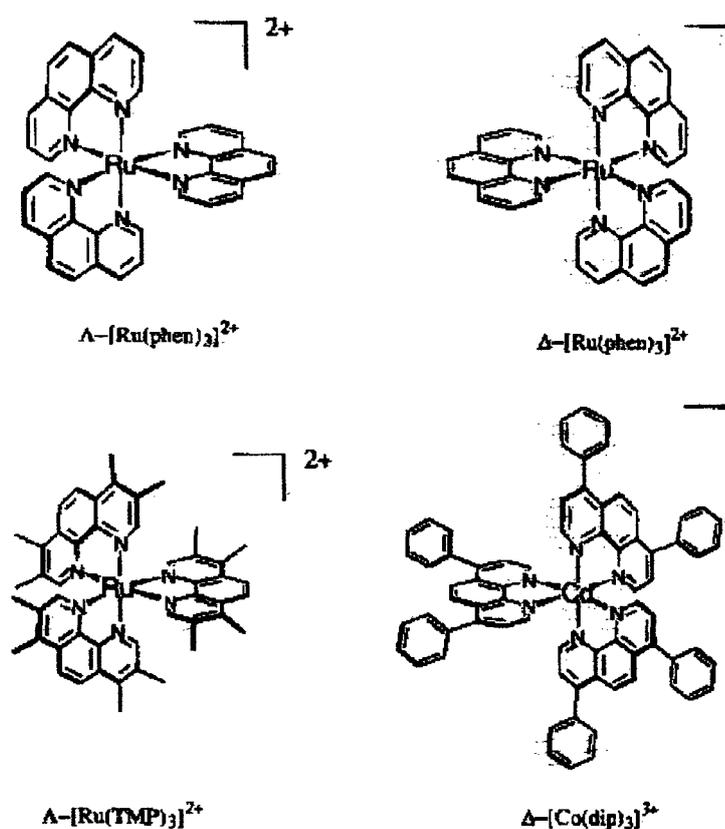


Figura 6 - Primeiros complexos octaédricos intercalantes³⁸

1.8 Fotoclivagem de Ácidos Nucleicos

Há uma classe de agentes de clivagem de ácidos nucleicos que são ativados fotoquimicamente. Nesses compostos os estados excitados podem

iniciar uma série de reações químicas que em última instância levam à clivagem do ácido nucleico. Uma característica importante desses agentes é o fato de que todos os componentes do sistema a ser estudado podem ser adicionados sem que a reação química se inicie até que a amostra seja irradiada.⁴¹

A habilidade no controle da luz pode ser vantajosa em uma variedade de aplicações em processos bioquímicos que ocorrem em tempo determinado como a transcrição do DNA ou tradução do RNA mensageiro.⁴¹ Talvez o mais importante aspecto na clivagem fotoinduzida é o fato de que a luz pode atuar como um cofator muito seletivo em uma reação química. Desde que o cromóforo do agente de fotoclivagem seja sensível a luz em comprimentos de onda maiores do que 300 nm, onde ácidos nucleicos e a maioria das proteínas são transparentes, alcança-se uma excitação seletiva do agente de clivagem. Isto é crítico para limitar-se o número de modos de reação no sistema tão bem quanto na análise dos mecanismos de reação.⁴¹

Um outro aspecto desses agentes de clivagem envolve os fatores que determinam a seletividade de seqüência de clivagem. A observação de uma clivagem preferencial em uma seqüência particular poderia ser devido a uma preferencial ligação ou reatividade naquele sítio. Por exemplo, dever-se-ia esperar que um agente de clivagem que funciona por abstração de átomos de hidrogênio de resíduos de açúcar clivaria em qualquer seqüência já que um resíduo de açúcar está presente em cada nucleotídeo. Todavia, se um agente de clivagem possui uma alta afinidade por um sítio, pode resultar uma clivagem preferencial. Alternativamente, uma ligação deveria ocorrer com comparável afinidade em todos os sítios, mas a orientação do agente de clivagem sobre o ácido nucleico em certos sítios pode levar a uma maior ou menor eficiência de reação naqueles sítios. Estes aspectos são ampliados dado o curto tempo envolvido para ocorrer a reação desde que o agente de clivagem deve reagir antes de retornar ao estado fundamental, um processo que pode ser tão curto quanto umas poucas centenas de picosegundos. Isto pode limitar o número de

orientações que o agente fotoclivante pode dispor durante seu tempo de vida reacional.⁴¹

O íon Uranil (UO_2^+) foi primeiramente introduzido como um agente fotoclivante por Nielsen e colaboradores em 1988.⁴² Eles observaram que a irradiação de UO_2^+ na presença de DNA superhelicoidizado poderia introduzir cortes sobre o DNA. Fotoclivagem do DNA por complexos de Rodio (II) contendo o ligante phi (phi = 9,10 – fenantrenoquinonadiimina) tem sido estudada detalhadamente por Barton e colaboradores.⁴³

A fotoclivagem também ocorre por compostos orgânicos. Trabalhos iniciais por Sugiura e colaboradores focalizaram sobre os produtos naturais Esperamicin e Neocarzinostatin.⁴⁴ Estes compostos são normalmente ativados por redução, mas a irradiação também leva a clivagem do DNA superhelicoidizado.

Um dos agentes de clivagem de DNA mais bem conhecidos é o radical hidroxila, que abstrai átomos de hidrogênio da desoxiribose produzindo radicais açúcar e água. Vários métodos existem para produzir radicais hidroxil, o mais simples envolve irradiação do peróxido de hidrogênio com luz UV, levando a homólise da ligação O – O. Mc Gregor mostrou que a irradiação de 100 mM de H_2O_2 na presença de DNA resulta na clivagem espontânea e inespecífica do mesmo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o mecanismo de clivagem, sobre a dupla hélice de DNA, do complexo metálico $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]$ (CuMFF).

2.2 Objetivos Específicos

- *Determinar as melhores condições de temperatura, pH e força iônica para a ação de CuMFF sobre a dupla hélice de DNA;
- *Estudar o mecanismo de clivagem através da adição de captadores de radicais livres e o tipo de interação entre CuMFF e o DNA pelo uso de técnicas no UV - VIS;
- *Determinar parâmetros cinéticos da reação de clivagem;
- *Analisar a especificidade de CuMFF na clivagem do DNA através de técnicas de eletroforese de alta resolução em Uréia / Poliacrilamida.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os reagentes químicos utilizados neste estudo foram:

LiClO₄.3H₂O - Aldrich

Azul de bromofenol; acrilamida 40 %; persulfato de amônio; agarose; tris-HCl; EDTA; bind silane; repel silane - Amersham Biosciences

Glicerol - Vetec

DMSO; NaCl; CaCl₂; NaOH; SDS; acetato de potássio; isopropanol; etanol; ácido bórico; ácido acético; nitrato de prata; carbonato de sódio; tiosulfato de sódio; HCl; agar - Nuclear

PIPES - Sigma

Urea; TEMED - Promega

Brometo de etídio - Life Technologies

CHES - USB

Formaldeído 37 % - Synth

O plasmídeo pSG-Nor-1 foi gentilmente cedido pelo Dr. Mário Zakin (Institut Pasteur - Paris).

Todos os reagentes utilizados nas reações de sequenciamento, com exceção do DNA plasmidial foram obtidos da Promega.⁴⁵

As vidrarias, os materiais de consumo e os equipamentos utilizados foram:

Cole Parmer- eppendorfs; falcons; ponteiras

Gilson-pipetman- pipetas automáticas;

Revan- centrífuga Ciclo C.I.;

Eppendorf- centrífuga;

Scout- balança BJ087704

Biomatic- estufa

Quimis- estufa

Pyrex- vidraria;

Minicycler M. J. Research- termociclador.

As cubas de eletroforese horizontais utilizadas foram:

HORIZON 11.14 da Life Technologies

Mini Gel Migration Trough da Cosmo BIO CO. LTD.

GNA 100 da Amersham Biosciences;

As fontes utilizadas para essas cubas horizontais foram:

250 EX da Life Technologies

250 da Life Technologies

O transiluminador utilizado para a visualização dos géis foi o modelo FLX – 20 M da Vilber Lourmat. Utilizado no comprimento de onda de 312 nm onde o brometo de etídio intercalado ao DNA emite fluorescência.⁴⁶

O sistema de eletroforese vertical utilizado foi uma cuba vertical “Hofer SQ3 Sequencer” da Amersham Biosciences, e uma fonte modelo EPS 3501 da Amersham Pharmacia Biotech.

3.1.1 CuMFF

Embora um grande número de nucleases naturais seja conhecido, o desenvolvimento de nucleases sintéticas tornou-se de grande utilidade e interesse. O desenvolvimento de CuMFF foi baseado em quatro itens fundamentais para que o mesmo pudesse agir como uma nuclease química: (a) fornecer dois sítios lábeis *cis*-orientados para coordenar ambos o substrato e uma molécula de água; (b) reduzir o pKa de uma molécula de água coordenada, isto é fornecer um nucleófilo hidróxido ligado ao metal em pH próximo de

neutro; (c) ativar o substrato através de um ataque nucleofílico e/ou estabilizar o estado de transição e (d) liberar os produtos a uma velocidade razoável.

O complexo CuMFF foi sintetizado pela Doutora Marciela Scarpellini no laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC sob a orientação do prof. Doutor Ademir Neves.

A representação esquemática do ligante BMPAMFF coordenado a um átomo de Cobre neste complexo é apresentada na figura 7. BMPAMFF foi sintetizado de acordo com modificações,⁴⁷ realizadas por Neves e colaboradores, na rota sintética descrita na literatura.⁴⁸ Ele foi obtido com bons rendimentos e com grau de pureza adequado para a utilização na síntese inorgânica de CuMFF. O ligante foi totalmente caracterizado por espectroscopia de infravermelho e de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio.⁵⁰ Trata-se de um ligante tetradentado.

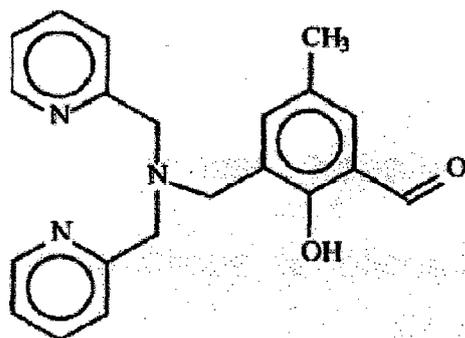


Figura 7 - Representação Esquemática de BMPAMFF

A estrutura A do complexo metálico CuMFF cristaliza na forma de monocristais azuis-claros pertencentes ao sistema cristalino triclinico. Na figura 8 é apresentado um ZORTEP⁴⁹ do complexo CuMFF com estrutura A.

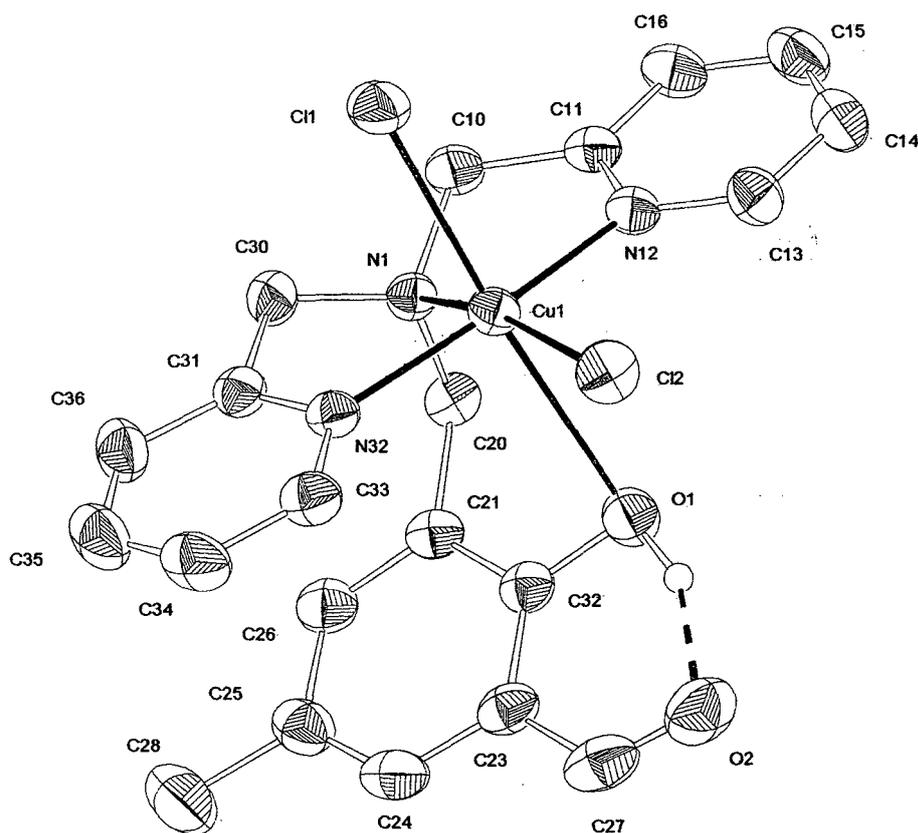


Figura 8 – ZORTEP⁴⁹ do complexo CuMFF com estrutura A

Na figura 8 pode-se observar que nesse complexo o centro metálico encontra-se em um ambiente de coordenação N_3Cl_2O com geometria octaédrica distorcida. O plano equatorial está composto por três átomos de nitrogênio provenientes do ligante e um ânion cloreto, de maneira que os nitrogênios piridínicos N (12) e N (32) encontram-se *trans* entre si e *cis* ao nitrogênio amínico N (1) e ao cloreto Cl (2). Completando a esfera de coordenação do centro metálico encontram-se em posições axiais o átomo de oxigênio fenólico O (1) e o ânion cloreto Cl (1). A longa distância de ligação Cu (1)-O (1) revela uma fraca interação entre estes átomos e sugere uma coordenação do grupo fenol na sua forma protonada.⁵⁰

O complexo CuMFF de estrutura B também foi sintetizado pela Doutora Marciela Scarpellini do grupo do professor Dr. Ademir Neves sendo que este é a espécie monodesprotonada de A. Ele cristaliza na forma de monocristais verdes-oliva ou vermelhos dependendo do ângulo de incidência de luz. Esses cristais são pertencentes ao sistema cristalino monoclinico. Um ZORTEP⁴⁹ deste complexo é apresentado na figura 9.

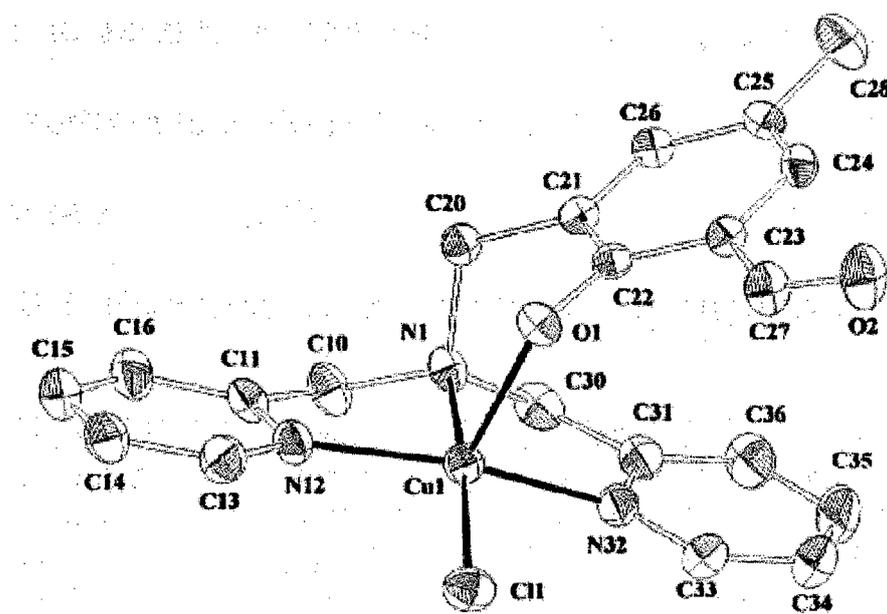


Figura 9 – ZORTEP⁵⁰ do complexo CuMFF com estrutura B

Como pode ser observado na figura 9, o íon Cu^{II} encontra-se agora em uma geometria piramidal de base quadrada, porém com o ligante ocupando as mesmas posições observadas na estrutura A. Sendo assim, o plano basal está composto por três átomos de nitrogênio do ligante e um cloreto, onde os nitrogênios N (12) e N (32) dos anéis piridínicos estão *trans* entre si e apresentam distâncias de ligação similares às observadas para a estrutura A.

Ainda no plano basal, o nitrogênio amínico N (1) está *trans* ao cloreto Cl (1) e ambos apresentam distâncias de ligação ao metal semelhantes às encontradas na estrutura A. Completando a esfera de coordenação do íon Cu^{II} e ocupando a posição axial encontra-se o grupo fenolato, cujo encurtamento da ligação Cu (1)-O (1) relativamente a estrutura A indica sua coordenação de forma desprotonada. Esse tipo de coordenação reflete em uma geometria piramidal de base quadrada, como uma consequência conjunta dos efeitos *trans* e Jahn-Teller. Uma vez que uma distância tão curta ocorre na posição axial, o ligante *trans* a esse grupo tende a distanciar-se do centro metálico no sentido de compensar a desestabilização de energia ocorrida no eixo z pela aproximação do ligante fenolato, fato pelo qual não se observa a presença de um segundo ligante cloreto na estrutura B.⁵⁰

Há ainda possivelmente a existência de uma outra estrutura adquirida por CuMFF que chamaremos de C e que ainda não pode ser completamente definida. Supõe-se tratar-se de uma espécie dimérica com dois átomos de Cobre coordenados ao ligante.

Essas três formas estruturais, A, B e C, se interconvertem de acordo com a variação do pH como mostrado na figura 10. Os cruzamentos das linhas representam os valores de pKas para o grupo fenol (5,7) e para a molécula de água coordenada ao Cobre na estrutura B (9,3).

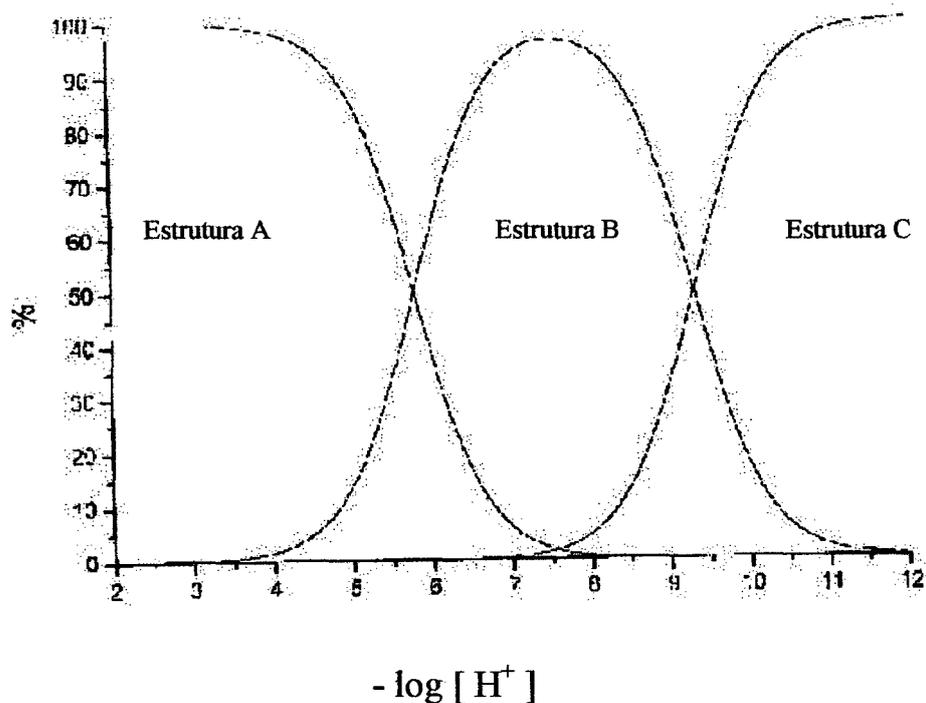


Figura 10 - titulação potenciométrica para o complexo CuMFF. Nesta figura observa-se a distribuição, em função do pH, das três formas estruturais de CuMFF.

O complexo CuMFF apresenta a característica de possuir dois sítios lábeis orientados *cis* entre si indicando que possa ser testado quanto à sua atividade hidrolítica.⁵⁰ Porém, o valor do pKa da molécula de água coordenada na posição equatorial (determinado via titulação potenciométrica igual a 9,3) é relativamente maior que o da neutralidade, mas ainda encontra-se na faixa de atividade ótima⁵³ apresentada pelas fosfatases alcalinas (pH 8,5-10). Esses dois fatores conduziram à realização de estudos de hidrólise do diéster bis(2,4-dinitrofenil)fosfato⁵⁶ e de clivagem de DNA. Esses estudos demonstraram que CuMFF não demonstra atividade hidrolítica do bis(2,4-dinitrofenil)fosfato⁵⁰ mas apesar disso os estudos de clivagem de DNA foram levados adiante.

3.2 Métodos

3.2.1 Eletroforese

Uma molécula carregada se move em um campo elétrico. Esse fenômeno chamado de eletroforese, oferece um poderoso meio de separação de macromoléculas.

Para estabelecer condições de separação eletroforética algumas regras físicas devem ser observadas:

A força dirigida na eletroforese é o produto da carga Θ_{\pm} de uma substância pelo campo elétrico E (V / cm). Para a velocidade de migração de uma substância v (cm / s):

$$v = E \Theta_{\pm} / R$$

onde Θ_{\pm} é a carga líquida que pode ser obtida da soma das cargas elementares. Então uma certa força de campo é necessária para uma migração eletroforética. A constante friccional R é dependente do raio molecular r (raio de Stokes) em cm e da viscosidade, η , do meio de separação medida em $N s / cm^2$. Para alcançar uma força de campo a voltagem U deve então ser aplicada, ela é medida em volt (V) e a distância de separação d em cm .

$$U = E d$$

Se um campo elétrico é aplicado a um meio condutor (tampão), uma corrente elétrica, I , fluirá. Ela é medida em amperes (A), sendo usualmente dada em mA . A magnitude da corrente depende da força iônica do tampão. O produto da voltagem e da corrente é a potência P dada em watt (w).

$$P = U I$$

O produto da potência pelo tempo é a energia. Durante a eletroforese parte da energia elétrica é transformada em calor. Por esta razão a temperatura deve ser controlada durante a eletroforese. Desde que a eficiência de resfriamento, que é a dissipação de calor, não pode ser indefinidamente aumentada, uma certa intensidade não deve ser excedida.⁵¹

As separações eletroforéticas são quase sempre executadas em géis (ou em suportes sólidos como o papel) em vez de em solução livre por dois motivos. Primeiro os géis suprimem as correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura, o que é necessário para uma separação eficiente. Segundo, os géis servem de peneiras moleculares que acentuam a separação.⁸

Na realização da eletroforese tem-se alguns critérios a serem obedecidos:

Quanto às amostras: Um importante critério na escolha do método eletroforético apropriado é a natureza da amostra a ser analisada. Não deve haver partículas sólidas ou “grandes” componentes suspensos em solução. Estes interferem com a separação por bloquear os poros da matriz. A natureza do meio, por exemplo do gel, depende do tamanho da molécula a ser analisada.⁵¹ Moléculas que sejam pequenas em relação aos poros do gel movem-se prontamente, enquanto moléculas muito maiores são quase imóveis. Os tamanhos dos poros podem ser controlados pela escolha de concentrações variáveis do gel.⁸

Quanto ao tampão: A separação das amostras é feita em um tampão com um valor preciso de pH e uma força iônica constante. A força iônica deve ser tão baixa quanto possível para que tanto a contribuição dos íons da amostra para a corrente total quanto sua velocidade sejam suficientes. Durante a eletroforese os íons do tampão migram através do gel semelhantemente aos íons da amostra: íons negativamente carregados para o ânodo e os positivamente carregados para

o cátodo. Isto deve ocorrer com o menor gasto de energia possível, caso contrário muito calor é produzido. Uma capacidade mínima de tamponamento é necessária para que os valores de pH das amostras analisadas não tenham qualquer influência sobre o sistema.⁵¹

Quanto ao gel: os géis de poliacrilamida são usados para separar fragmentos de até 1000 pb enquanto géis de agarose, mais porosos, até 20 Kb.⁸ Quando for necessário analisar amostras com diâmetro acima de 10 nm utiliza-se, então, géis de agarose. A agarose é um polissacarídeo obtido de uma alga vermelha do mar (Figura 9). Por remoção da agarpectina, géis de vários graus de pureza podem ser obtidos. Eles são caracterizados por seu ponto de fusão (35 a 95 °C) e o grau de eletroosmose (mr) (que é dependente do número de grupos polares). Em geral géis com um tamanho de poro de 150 nm são 1 % (m/v) e com 500 nm 0,16 %. A agarose é dissolvida em água fervente e forma um gel após o resfriamento. Durante este processo formam-se duplas hélices que são unidas lateralmente para formar filamentos relativamente finos (Figura 11).

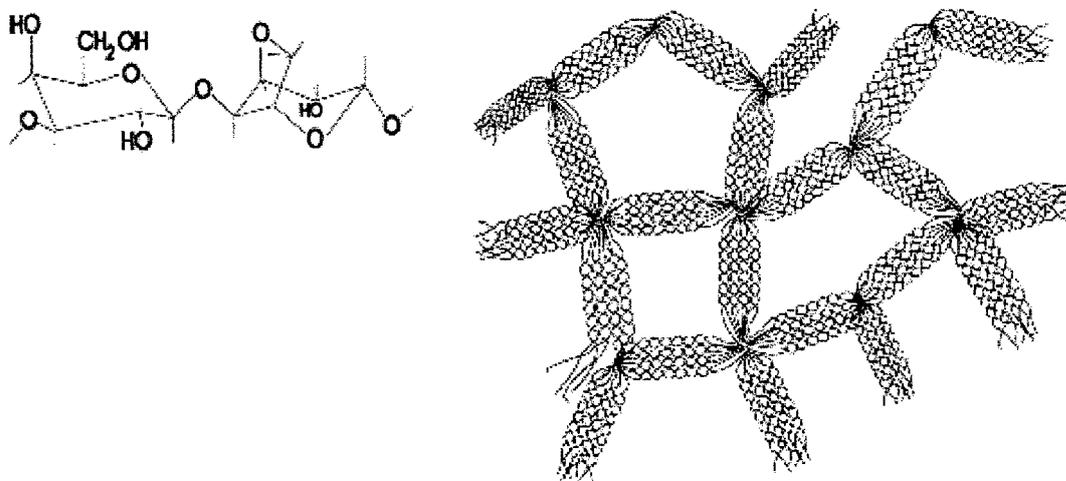


Figura 11 - Estrutura Química da agarose e estrutura do polímero formado durante a gelificação.

Gel de agarose:

Utilizou-se géis de agarose 0,8 % (m/v) que foram preparados dissolvendo-se, com aquecimento, a agarose em TBE 0,5 X (tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM e pH 8,5) e, após resfriamento a 60 °C, adição de brometo de etídio na proporção de 0,2 µg por mL de gel. Esse sistema foi posteriormente levado a uma forma que definia a forma do gel e o tamanho de seus poços.

3.2.2 Esterilização dos materiais

Todos os materiais utilizados nesse trabalho foram esterilizados pelo uso do vapor d'água sob pressão. Este é o método mais prático e seguro de aplicação do calor úmido.

Em um sistema fechado de volume constante, um aumento de temperatura permitirá um aumento de pressão. Vapor d'água sob pressão fornece temperaturas maiores do que aqueles possíveis com vapor sem pressão ou água fervente. Há a vantagem também de um aquecimento rápido com maior penetração.⁷

O aparelho por nós utilizado para esterilizar com vapor sob pressão foi a autoclave. A câmara de parede dupla da autoclave foi primeiramente lavada com vapor fluente, para remover todo o ar. Foi então preenchida com vapor puro e mantida a pressão de 1 kgf/cm², na qual a temperatura do vapor é 120 °C, por 20 minutos (é essencial que todo o ar residual inicialmente presente na câmara seja completamente substituído por vapor d'água. Se o ar estiver presente, reduzirá a temperatura interna da autoclave. É a temperatura, e não a pressão no interior da câmara, que mata os microrganismos).

3.2.3 Obtenção dos plasmídeos

A obtenção dos plasmídeos baseou-se em cinco etapas : preparação de bactérias competentes, transformação dessas bactérias com o plasmídeo de interesse, extração do plasmídeo, purificação e quantificação do mesmo.

Para a realização destas etapas, primeiramente preparou-se os meios de cultivo de bactérias que têm a seguinte composição:

Meio LB líquido:

triptona 1 % (proteínas parcialmente degradadas, tais como o hidrolisado da caseína do leite e hidrolisado de proteínas de soja)⁷, extrato de levedura 0,5 % (substância química complexa, contém vitaminas do complexo B, sua composição exata é desconhecida)⁷ NaCl 0,5 %, ampicilina 50 µg / mL e pH 7,5.

Meio LB sólido:

triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 % e NaCl 0,5 %, agar 1,5 %, ampicilina 50 µg / mL e pH 7,5.

Preparação de Bactérias Competentes⁴⁶

Bactérias competentes são aquelas que por tratamento químico se tornam passíveis de transformação, ou seja, facilmente incorporam fragmentos de DNA.

Para o preparo destas inoculou-se 2 mL de uma cultura de bactéria (crescida durante uma noite) em 50 mL de meio LB líquido. Incubou-se, em um agitador, a 37 °C até a densidade ótica 0,4 a 600 nm. Distribuiu-se a cultura em tubos de polipropileno. Deixou-se os tubos no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 1600 g por sete minutos. Desprezou-se o sobrenadante por inversão. Ressuspendeu-se o precipitado em 1,5 mL de CaCl₂ 1 M e transferiu-se para tubos de microcentrífuga. Deixou-se os tubos no gelo por 30 minutos. Centrifugou-se três minutos a 2500 g. Ressuspendeu-se o precipitado em 1,5 mL

de CaCl_2 1M. Dividiu-se em aliquotas de 100 μL por tubo e congelou-se em banho de álcool mantendo-se no freezer a -20 ou -80 $^\circ\text{C}$ (a -20 se a bactéria fosse destinada a ser utilizada em poucos dias e a -80 $^\circ\text{C}$ se utilizada após meses).

Transformação de bactéria competente⁴⁶

Retirou-se as bactérias competentes e os plasmídeos do freezer e descongelou-se no gelo. Transferiu-se 1 μL da solução com plasmídeos (aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para o tubo com 50 μL de bactérias. Deixou-se no gelo por 15 minutos. Levou-se o tubo (bactérias + plasmídeos) a um banho (37 a 42 $^\circ\text{C}$) por 1 minuto. Adicionou-se 1 mL de meio LB líquido ao tubo. Deixou-se por uma hora na estufa a 37 $^\circ\text{C}$. Centrifugou-se por 2 minutos a 5000 g. Retirou-se 700 μL do sobrenadante. Ressuspendeu-se as bactérias com o restante da solução. Transferiu-se para uma placa com LB e ampicilina (100 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Com uma alça de vidro em LB espalhou-se a solução na placa. Levou-se a placa para a estufa a 37 $^\circ\text{C}$ com a tampa virada para cima por uma hora. Após virou-se a placa com a tampa para baixo e deixou-se crescendo durante a noite. Fez-se paralelamente uma placa só com a bactéria sem o plasmídeo. Armazenou-se em geladeira por no máximo dez dias (após repicou-se).

Replicação das Bactérias:

Para o cultivo de culturas puras da bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse fez-se a utilização do método de esgotamento por meio de estrias superficiais.⁷

A amostra foi semeada na superfície do meio LB solidificado (em uma placa de petri) com uma alça de semeadura para esgotar a população (tudo em condições estéreis).

O objetivo é diminuir a população microbiana, assim as células individuais estarão localizadas a uma certa distância umas das outras. As células individuais, se estiverem distantes o suficiente, produzirão uma colônia que não entra em contato com outras colônias. Todas as células em uma colônia têm o mesmo parentesco.

Inoculação em meio líquido

Para a posterior extração do plasmídeo de interesse (pSG-Nor-1) fez-se a inoculação do mesmo em um meio de cultivo líquido (LB com ampicilina) com a utilização de uma alça de semeadura e deixou-se o sistema sob agitação a 37 °C durante uma noite.

Extração de DNA plasmidial

Utilizou-se duas formas para a extração “Large Prep” de DNA plasmidial: método da lise alcalina⁴⁶ e sistema de purificação de plasmídeos (*Concert High Purity Plasmid Purification Systems*)⁵² da GibcoBRL.

Lise Alcalina⁴⁶

Colocou-se o meio com a bactéria de interesse em tubos falcon e centrifugou-se por dez minutos a 6000 g. Descartou-se o sobrenadante e

adicionou-se ao precipitado 400 μ L de GTE (glicose 50 mM, tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Ressuspendeu-se até dissolver o precipitado. Adicionou-se 100 μ L de GTE / lisozima (25 mg / mL). Ressuspendeu-se o pellet e deixou-se por dez minutos a temperatura ambiente. Após adicionou-se 1 mL de NaOH / SDS (200 μ L de NaOH 5 M, 250 μ L de SDS 20 % e 4550 μ L de água miliQ. Misturou-se vagarosamente até que a solução ficou homogênea, limpa e viscosa. Deixou-se dez minutos no gelo. Adicionou-se 750 μ L de acetato de potássio 5 M e agitou-se até que diminuiu a viscosidade e formou-se um precipitado branco. Deixou-se dez minutos no gelo. Centrifugou-se por 15 minutos a 20000 g a -4 °C. Transferiu-se o sobrenadante para tubos novos de microcentrífuga. Adicionou-se 0,6 vezes o volume de cada solução de isopropanol gelado, misturou-se por inversão e deixou-se por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se dez minutos a 15000 g. Lavou-se o pellet com 200 μ L de etanol 70 % gelado em cada tubo e centrifugou-se por cinco minutos a 10000 g. Aspirou-se o etanol e deixou-se secar a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se em TE (tris 10 mM e EDTA 1 mM).

Extração com Kit ⁵²

Centrifugou-se 300 mL de uma cultura de bactéria, mantida sob crescimento durante uma noite, com o plasmídeo pSG-Nor-1.

Aplicou-se 30 mL de um tampão de equilíbrio E₄ (600 mM NaCl, 100 mM acetato de sódio, 0,15 % triton X – 100 (v/v) e pH 5,0) a uma coluna de sílica e deixou-se a solução passar pela coluna por fluxo de gravidade. Adicionou-se 10 mL de um tampão de suspensão de células E₁ (50 mM tris pH 8,0 e 10 mM EDTA) contendo Rnase ao precipitado e ressuspendeu-se até a homogeneidade. Adicionou-se 10 mL de uma solução de lise celular E₂ (200

mM NaOH e SDS 1% w/v). Centrifugou-se a mistura a 15000 g por 10 min a temperatura ambiente. Pipetou-se o sobrenadante para a coluna e deixou-se a solução passar por fluxo de gravidade. Lavou-se a coluna com 60 mL de um tampão de lavagem E₅ (800 mM NaCl, 100 mM acetato de sódio pH 5,0). Eluiu-se o DNA por adição de 15 mL de um tampão de eluição E₆ (1,25 M NaCl, 100 mM tris pH 8,5) novamente por fluxo de gravidade. Adicionou-se 10,5 mL de isopropanol ao eluido, misturou-se e centrifugou-se a mistura a 15000 g e a 4 °C por 30 min. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o precipitado de DNA plasmidial com 5 mL de etanol 70 % e centrifugou-se a 15000 g e a 4 C por 5 min. Retirou-se por pipetação o etanol e secou-se o precipitado a temperatura ambiente por 10 min. Dissolveu-se o precipitado de DNA plasmidial em 500 µL de TE.

3.2.4 Purificação e quantificação dos plasmídeos ⁴⁶

Os plasmídeos extraídos muitas vezes estão contaminados com impurezas que podem atrapalhar o experimento a que esses serão submetidos. Proteínas, RNA, DNA genômico e ribonuceotídeos são contaminantes frequentes.

A contaminação por RNA e DNA genômico foi detectada pela visualização de uma amostra da solução plasmidial em um gel de agarose. A contaminação por proteínas e ribonucleosídeos foi detectada pela medida da razão A_{260}/A_{280} utilizando um espectrofotômetro UV/VIS Beckman DU-7. Razões de 1,8 a 1,9 indicam um plasmídeo puro.⁴⁶

A quantidade de DNA (purificado) também foi determinada por medidas da razão A_{260}/A_{280} utilizando-se o mesmo espectrofotômetro acima citado. Utilizou-se a fórmula:

$$C (\mu\text{g/mL}) = A_{260} / 0,020$$

onde C é a concentração do plasmídeo. Esta equação pode ser aplicada somente para a quantificação de DNA dupla fita.⁴⁶

Nas amostras de plasmídeo contaminadas com RNA adicionou-se a enzima Rnase. Preparou-se uma solução de Rnase dissolvendo-se a mesma a 10 mg / mL em 10 mM de tris (pH 7,5) e 15 mM de NaCl. Aqueceu-se 10 min a 80 °C e lentamente esfriou-se para a temperatura ambiente guardando as alíquotas a – 20 °C. Diluiu-se essa solução para 1 mg / mL nas amostras de plasmídeo.⁴⁶

Para a purificação em geral dos plasmídeos obtidos fez-se a reprecipitação com sal e etanol da seguinte forma⁴⁶:

Adicionou-se um décimo do volume da solução plasmidial de um sal bem concentrado como acetato de amônio 7,5 M ou acetato de potássio 5 M. Em seguida adicionou-se 2,5 vezes o volume da solução plasmidial de etanol 100 % gelado. Deixou-se o sistema 1 hora no freezer a – 20 °C. Após centrifugou-se a 15000 g por vinte minutos. Lavou-se com etanol 70 % gelado e secou-se a 37 °C. Ressuspendeu-se em TE.

3.2.5 Clivagem de pSG-Nor-1 com CuMFF:

Dependência com a temperatura e com o pH:

A clivagem do pSG-Nor-1 por CuMFF foi realizada em soluções com um volume final de 20 μL na qual estavam presentes 0,5 μg do plasmídeo e diferentes concentrações do complexo a determinado pH. Nos testes com variação de temperatura as soluções foram mantidas a pH 8,0 (tris-HCl 100 mM

) e incubadas a 37 °C e 50 °C por 24 horas. Nos testes com variação de pH utilizou-se o tampão PIPES 100 mM para os testes a pH 7,0; o tampão tris-HCl 100 mM para pH 8,0 e o tampão CHES 50 mM para pH 9,0. As amostras foram incubadas a 50 °C por 24 h.

Em seguida, 2 µL do tampão de amostra (tris-HCl 5 mM, EDTA 5mM, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%) foram adicionados. As amostras foram analisadas em um aparelho de eletroforese, com géis de agarose 0,8% em TBE ,conforme detalhado anteriormente, utilizando-se uma diferença de potencial de 100 V. O DNA foi visualizado com brometo de etídio. O DNA foi quantificado pela análise das intensidades das bandas das fotografias de fluorescência, sob luz UV, após aquisição das imagens com o programa Scion Image. As intensidades das fluorescências foram corrigidas de acordo com as diferentes afinidades de ligação do brometo de etídio para a forma I versus a forma II (multiplicando-se a forma por 1,42).

Dependência com a força iônica e adição de captadores de radicais livres:

As análises dos resultados bem como as amostras utilizadas para testes de controle de força iônica e captadores de radicais livres foram feitas de maneira similar às descritas anteriormente.

Nos testes com controle de força iônica utilizou-se LiClO₄ como sal gerador de força iônica variável e as amostras foram incubadas a pH 8,0 (tris – HCl) por 24 horas a 50 °C. Acima de 0,2 M de LiClO₄ ocorre precipitação de CuMFF o que impossibilita o estudo da reação de clivagem a forças iônicas mais elevadas.

Os captadores de radicais livres glicerol e dimetil sulfóxido (DMSO) foram adicionados às amostras (pH 8,0 tris-HCl) para alcançar uma

concentração 400 mM. As amostras foram igualmente incubadas a 50 °C por 24 horas.

3.2.6 Cinética de clivagem de DNA plasmidial

A cinética foi feita a 50 °C coletando-se amostras de 15 µL de uma solução mãe com o plasmídeo e concentrações variáveis de CuMFF, a pH 8,0, interrompendo-se a reação por resfriamento do sistema a -8 °C.

Após todas as amostras terem sido coletadas estas eram descongeladas em banho de gelo, imediatamente adicionados 2 µL do tampão de amostra gelado e aplicadas em um gel de agarose 0,8% em TBE 0,5 X. O gel era colocado em um aparelho de eletroforese sob uma ddp de 100V por aproximadamente 60 min.

Os dados obtidos foram tratados da mesma forma que descrito anteriormente.

3.2.7 Análise Espectrofotométrica

Para os experimentos seguintes utilizou-se um espectrofotômetro HP 8452A.

Analizando o tipo de interação entre CuMFF e o DNA:

Com o objetivo de determinar se CuMFF é um complexo metálico que se intercalava na dupla hélice de DNA (de modo a alterar seu espectro no UV)

realizou-se uma série de medidas no UV-VIS de uma solução de CuMFF a pH 8,0 com a posterior adição de DNA plasmidial (pBSK-II).

Preparou-se uma solução mãe com CuMFF e tris-HCl. Dividiu-se em duas e a uma delas adicionou-se 100 μ L de água milliQ e fez-se uma medida no UV-VIS de 200 a 700 nm (efeito da diluição). À outra solução adicionou-se 100 μ L de pBSK-II (aproximadamente 130 μ g) e então fez-se a medida no UV-VIS.

Analisando se CuMFF permanecia ligado ao DNA após a clivagem:

Com o objetivo de se verificar se CuMFF permanecia de alguma forma ligado a dupla hélice de DNA após a reação de clivagem fez-se o seguinte experimento:

Primeiramente fez-se uma solução de reação onde estavam presentes DNA plasmidial e CuMFF em água a pH 8,0 (tris).

Fez-se um gel 0,8 % de agarose sem brometo de etídio e correu-se 1 poço com aproximadamente 2 μ L da solução de reação e 3 poços com 25 μ L da solução de reação (em todas as amostras adicionou-se “loading buffer”). Correu-se a 100 V. Cortou-se a tira de gel com os 2 μ L da solução e corou-se com brometo de etídio. Colocou-se ao lado do gel restante e, por comparação, cortou-se as fatias do gel aonde estariam as bandas restantes. Pesou-se essas amostra. Cortou-se pedaços do gel aonde não havia DNA até obter o mesmo peso e utilizou-se essa segunda amostra para fazer o branco. Solubilizou-se as duas amostras em um tampão de solubilização de gel⁵⁴ que continha perclorato de sódio concentrado, acetato de sódio e TBE (formulação de marca). Finalmente fez-se as medidas no UV-VIS, utilizando-se a segunda amostra como branco.

3.2.8 Localização do sítio de clivagem no DNA – sequenciamento

O DNA é geralmente sequenciado pela interrupção controlada da replicação.

Nesse experimento utilizou-se do **Método de Sanger** e de uma modificação do mesmo.¹⁰

No Método de Sanger a DNA polimerase I é usada para copiar uma determinada sequência de um DNA unifilamentar. A síntese parte de um fragmento complementar que pode ser obtido com uma enzima de restrição ou sintetizado quimicamente. Além dos quatro desoxiribonucleosídeos trifosfatos, a mistura de incubação contém um análogo 2'3' - didesoxi de um deles. A incorporação desse análogo bloqueia a posterior extensão da nova cadeia porque ele não tem a hidroxila 3' terminal necessária para formar a ligação fosfodiéster seguinte. Assim, são produzidos fragmentos de vários tamanhos nos quais o análogo didesoxi está na ponta 3'. Quatro de tais conjuntos de fragmentos com término de cadeia (um para cada análogo didesoxi) são então submetidos a eletroforese, e a sequência de bases do novo DNA pode ser lida pela coloração do gel com prata (ou no auto radiograma se os desoxiribonucleosídeos trifosfatos forem marcados com radioatividade).⁸

Preparação das amostras a serem utilizadas na reação de sequenciamento

Primeiramente fez-se a reação de pSG-Nor-1 com CuMFF: Fez-se uma solução a pH 8,0 (tris 100 mM) contendo 5 µg de pSG-Nor-1 e determinada quantidade de CuMFF para gerar concentrações de zero, oito e dez mM do mesmo. Essas amostras foram deixadas a 50 °C por 24 horas.

Após fez-se a purificação do plasmídeo utilizando-se o sistema *Concert Rapid PCR purification System* obtido da GIBCO BRL⁵⁵ da seguinte forma:

Adicionou-se 400 µL da solução de ligação H₁ (hidrocloreto de guanidina concentrado, EDTA, tris-HCl e isopropanol)^{*} em cada solução de reação (pSG-Nor-1 + CuMFF) e misturou-se completamente. Colocou-se uma coluna de sílica dentro de um tubo de polipropileno de 2 mL. Colocou-se a amostra na coluna. Centrifugou-se a 12000 g por dois minutos. Descartou-se o líquido no fundo. Colocou-se a coluna de volta no tubo e adicionou-se 700 µL do tampão de lavagem H₂ (NaCl, EDTA e tris-HCl)^{*} à coluna. Centrifugou-se a 12000 g por dois minutos. Descartou-se o líquido no fundo. Colocou-se a coluna em um tubo novo de 1,5 mL. Adicionou-se 50 µL de TE aquecido. Incubou-se 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000 g por quatro minutos.

Re-precipitou-se a solução de DNA obtida com sal e etanol, conforme descrito anteriormente e ressuspendeu-se cada amostra em 11 µL de TE. Assim as amostras estavam prontas para serem utilizadas na reação de sequenciamento.

^{*} Formulações de marca.

Preparação da reação de sequenciamento⁴⁵

As amostras relativas aos poços A, B, C, D, H, I, J, K, M, N, O, P foram preparadas seguindo-se o Método de Sanger.

Para as amostras A, B, C e D preparou-se uma única solução mãe contendo 5µL de “DNA Sequencing 5x Buffer”, 3,6 µL de “primer pUC / M13 foward”, 1,4 µL de água livre de nucleases e finalmente 1 µL de “Taq sequencing Grade” e adicionou-se 6 µL de pSG-Nor-1 (0,5 µg/µL). Adicionou-se 4 µL dessa solução mãe em quatro tubos contendo 2 µL de

d/dNTP mix, que contém os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos e um análogo 2'3'didesoxi de um deles (guanina para a amostra A, adenina para a amostra B, timina para a amostra C e citosina para a amostra D).

Para as amostras H, I, J, K preparou-se a mesma solução mãe porém contendo 6 μL de pSG-Nor-1 (aproximadamente 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) previamente tratado com 8 mM de CuMFF. Da mesma forma adicionou-se 4 μL dessa solução mãe em quatro tubos contendo 2 μL de d/dNTP mix, que contém os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos e um análogo 2'3'didesoxi de um deles (guanina para a amostra H, adenina para a amostra I, timina para a amostra J e citosina para a amostra K).

Para as amostras M, N, O, P também preparou-se a mesma solução mãe contendo 6 μL de pSG-Nor-1 (aproximadamente 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) previamente tratado com 10 mM de CuMFF. Da mesma forma adicionou-se 4 μL dessa solução mãe em quatro tubos contendo 2 μL de d/dNTP mix, que contém os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos e um análogo 2'3'didesoxi de um deles (guanina para a amostra M, adenina para a amostra N, timina para a amostra O e citosina para a amostra P).

A amostra relativa ao poço L continha simplesmente 2 μL de pSG-Nor-1 (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL de “DNA Sequencing 5x Buffer” e 2 μL de água livre de nucleases.

As amostras relativas aos poços E, F e G continham 2 μL de pSG-Nor-1 previamente tratado com 0 mM , 8 mM e 10 mM de CuMFF respectivamente, sendo que esse plasmídeo foi purificado como descrito adiante. Essas amostras ainda continham 1 μL de “DNA Sequencing 5x Buffer”, 1 μL do primer “pUC/M13 forward” 0,3 μL de Taq polimerase e 0,7 μL de dNTP mix 5 mM (que continha somente os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos)

Todas essas amostras foram levadas para um termociclador com o programa de sequenciamento Seq-3 detalhado adiante. Após o programa ter sido completado adicionou-se 3 μL “DNA sequencing stop solution”, que serve para parar a reação. As amostras foram então guardadas no freezer a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Programa de sequenciamento Seq – 3:

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 C	2 minutos
2	95 C	30 segundos
3	70 C	1 minuto

4 – voltar para passo 2 sessenta vezes.

5 – manter a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparação do gel de corrida ⁴⁵

Foi utilizado um gel de Acrilamida 6% e 7 M de urea. Primeiramente preparou-se as placas de vidro (uma placa maior e outra menor) que fazem o suporte do gel.

Preparação da placa menor: preparou-se uma solução com 6 μL de bind silane e 2 mL de uma solução 95 % etanol e 0,5 % ácido acético. Passou-se um papel com 2 mL dessa solução, esperou-se 5 min, aplicou-se 2 mL de etanol 95%, passou-se novamente um papel para espalhar a solução e repetiu-se esta última etapa duas vezes.

Preparação da placa maior: passou-se, com um papel, 2 mL de bind-silane nessa placa, esperou-se 10 min, lavou-se a placa com etanol e após com água. Removeu-se o excesso com papel toalha.

O gel foi preparado da seguinte forma: adicionou-se a um bécker 29,4g de uréia, 7 mL de TBE 10 X e 30 mL de água milliQ. Dissolveu-se a urea sob leve aquecimento e, após, adicionou-se 10,5 mL de acrilamida 40 % e completou-se para 70 mL. A seguir adicionou-se 700 µL de persulfato de amônio 10% e 40 µL de TEMED. Imediatamente colocou-se essa solução nas placas e adicionou-se o pente.

Corrida

Correu-se o gel no sistema de eletroforese vertical até ele atingir a temperatura de 50 °C (aproximadamente 1 hora).

Retirou-se as amostras do freezer e colocou-se em um banho maria a 70 °C por 2 min.

Aplicou-se 7 µL de cada amostra nos poços do gel. Correu-se o gel a 50 °C por 4 horas a 45W.

Coloração do gel de acrilamida/urea com prata ⁴⁵

Primeiramente preparou-se três soluções:

Solução A - para fixar: 10% de ácido acético glacial (2.L);

Solução B - para corar: 2 g de nitrato de prata e 3 mL de formaldeído 37 % .

Completou-se para 2 L de solução com água milliQ;

Solução C - para revelar: 60g de carbonato de sódio. Completou-se para 2 L com água destilada e resfriou-se a -8°C . Após adicionou-se 3 mL de formaldeído 37% e 400 μL de tiosulfato de sódio (10 mg/ mL).

A seguir separou-se as placas (o gel fica aderido à placa tratada com a solução de ligação), colocou-se o gel em uma bacia, cobriu-se com 2 litros da solução A e agitou-se por 20 min.

Após lavou-se o gel três vezes por dois minutos com água destilada, transferiu-se o mesmo para uma bacia com a solução B e agitou-se por trinta minutos. Mergulhou-se rapidamente o gel em água e o transferiu-se para uma bacia contendo um litro da solução C gelada (-8°C). Agitou-se até as bandas menores aparecerem, trocou-se então essa solução por mais um litro de solução C e agitou-se por mais alguns minutos. Adicionou-se nesse sistema um litro de solução A (já utilizada) e agitou-se por mais alguns minutos. Finalmente lavou-se com água destilada duas vezes e após colocou-se o gel para secar a temperatura ambiente.

4 Resultados e Discussão

A clivagem do DNA exibida por CuMFF é consideravelmente sensível a temperatura, pH, força iônica e tempo de reação.

4.1 Dependência da clivagem de DNA com a temperatura.

Como mostrado nas figuras 12 e 13 pode-se observar o desaparecimento da forma superenovelada (S) com o aumento da concentração de CuMFF indicando que CuMFF tem a capacidade de clivar a dupla hélice de DNA e que portanto é uma nuclease química.

Observa-se que o desaparecimento da forma superenovelada com o aumento da concentração de CuMFF é mais pronunciado a 50 °C (figura 13) do que a 37 °C (figura 12). Por exemplo a 37 °C e com 2 mM de CuMFF, figura 10, a forma superenovelada é quase totalmente transformada em forma circular ou degradada enquanto a 50 °C, figura 13, nessa mesma concentração toda a forma plasmidial superenovelada e circular relaxada são totalmete degradadas, isto evidencia a forte dependência reacional com a temperatura.

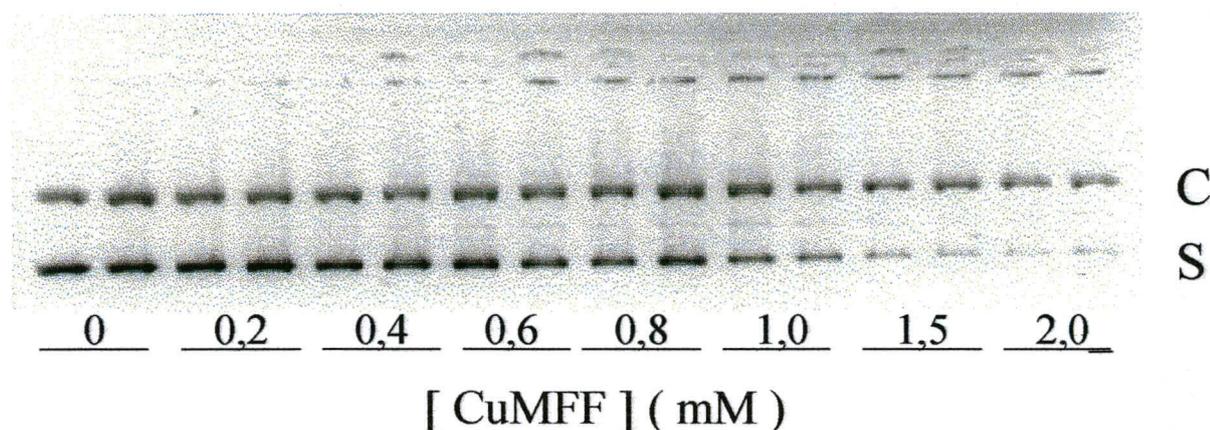


Figura 12 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 37 °C, pH 8,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF em duplicata. Na figura S representa a forma plasmidial superenovelada e C a forma circular relaxada. O desaparecimento da forma S com o aumento da concentração de CuMFF indica a ação de clivagem deste sobre o plasmídeo pSG-Nor-1.

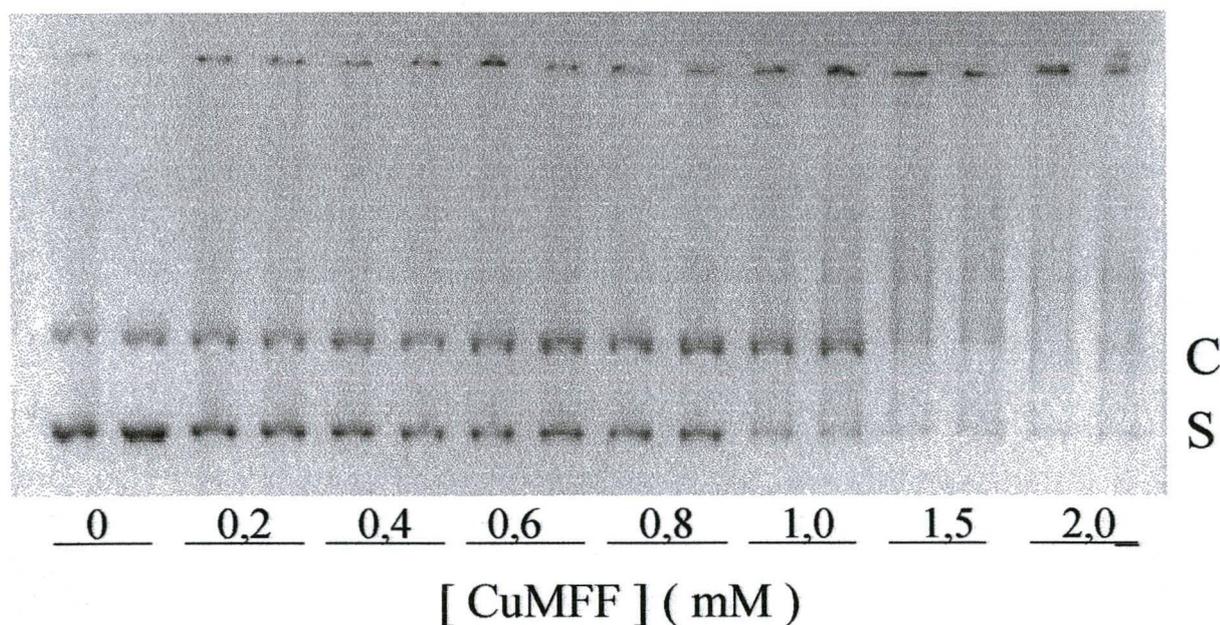


Figura 13 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 50 °C, pH 8,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF em duplicata. Na figura S representa a forma plasmidial superenovelada e C a forma circular relaxada. O desaparecimento da forma S com o aumento da concentração de CuMFF indica a ação de clivagem deste sobre o plasmídeo pSG-Nor-1.

As figuras 14 e 15 foram obtidas através da quantificação das figuras 12 e 13 e mostram claramente o decréscimo da forma superenovelada e o aumento da forma circular com posterior decréscimo devido a completa degradação do DNA.

Na temperatura de 37 °C observa-se que 50% de degradação ocorre à aproximadamente 1,3 mM de CuMFF enquanto a 50 °C em aproximadamente 0,6 mM de CuMFF evidenciando que a 50 °C a ação de CuMFF sobre o DNA é pelo menos duas vezes mais eficiente que a 37 °C.

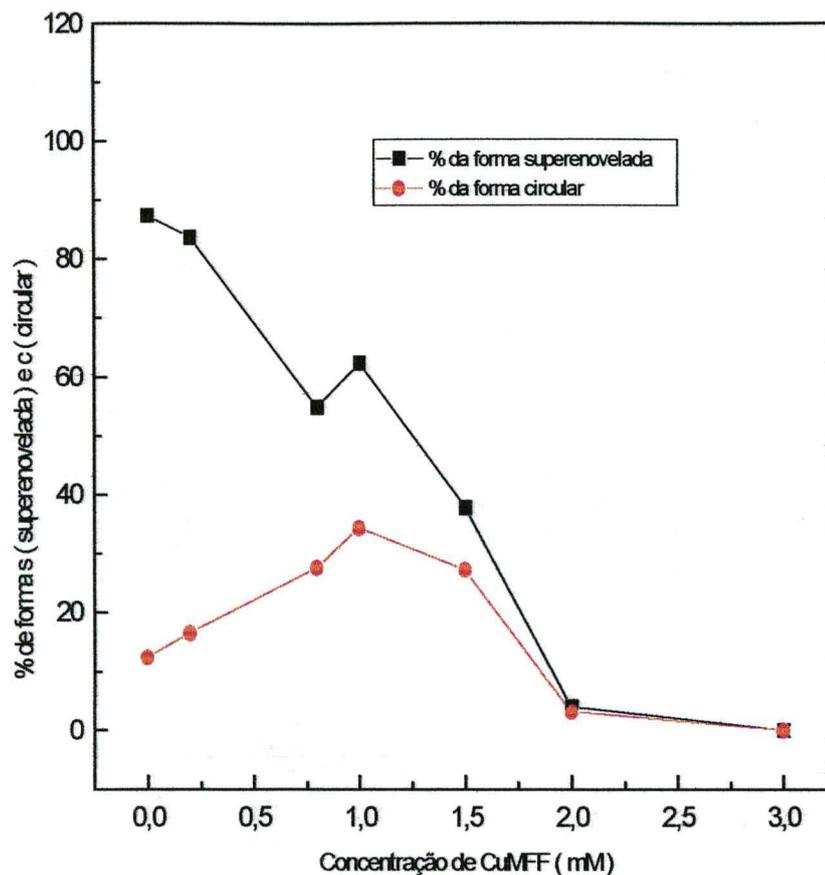


Figura 14– Quantificação da foto representada na figura 12. Temperatura de 37 °C, pH 8,0 e 24 h . Porcentagem da forma s (superenovelada) e c (circular) em função da concentração de CuMFF . Os valores representam as médias das duplicatas obtidas. O 100 % é dado pelo somatório das formas s e c quando a concentração de CuMFF é igual a zero.

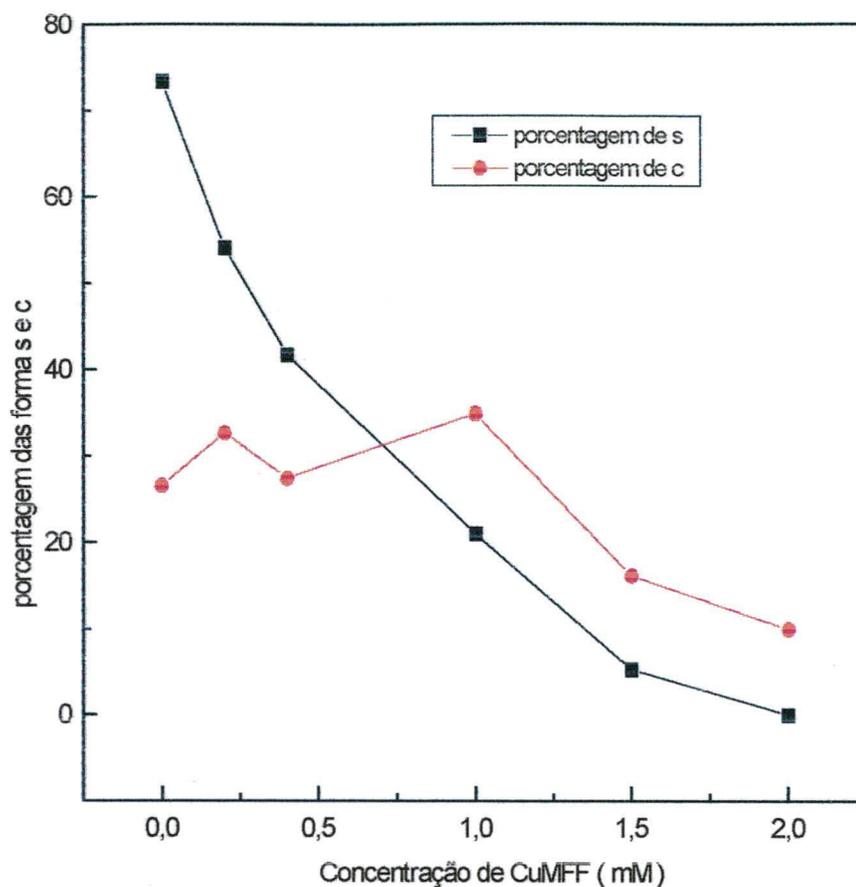


Figura 15 - Quantificação da foto representada na figura 13. Temperatura de 50 °C, pH 8,0 e 24 h. Porcentagem da forma s (superenovelada) e c (circular) em função da concentração de CuMFF . Os valores representam as médias das duplicatas obtidas. O 100 % é dado pelo somatório das formas s e c quando a concentração de CuMFF é igual a zero.

4.2 Dependência da clivagem de DNA com o pH

As figuras 16, 13 e 17 mostram os resultados obtidos de clivagem do DNA nos pHs 7,0, 8,0 e 9,0 na temperatura de 50 °C em um tempo de incubação de 24 horas. A figura 18 representa a quantificação dessas figuras.

Com base nas variações de estruturas adquiridas por CuMFF em função do pH, discutidas anteriormente (ver materias e métodos) podemos interpretar esses resultados.

A pH 7,0 além da estrutura molecular B adquirida pelo complexo CuMFF (o íon Cu encontrando-se numa geometria piramidal de base quadrada com apenas uma molécula de água coordenada na primeira esfera de coordenação), há uma pequena porcentagem da estrutura molecular A (com geometria octaédrica distorcida e com duas moléculas de água coordenadas ao centro metálico e *cis* entre si) que é a espécie monoprotonada de B.

A hidrólise de fosfatos diésteres têm sido proposta⁵⁶ ocorrer através de um mecanismo concertado em que um nucleófilo hidróxido ligado ao metal ataca o centro de fósforo. A molécula de água coordenada ao Cu e *trans* ao fenol no complexo A está mais disponível para atacar o centro de fósforo e portanto a reação de clivagem do DNA ocorre mais intensamente a pH 7,0 do que a pH 8,0 onde a espécie A praticamente não está presente.

Da mesma forma a maior intensidade de clivagem a pH 9,0 do que a 8,0 pode ser explicada devido provavelmente a estrutura C adquirida por CuMFF (ver materiais e métodos) que deve ser mais reativa do que a estrutura B e do fato de que nesse valor de pH há um equilíbrio entre essas duas espécies com uma menor, mais significativa, porcentagem da estrutura C presente.

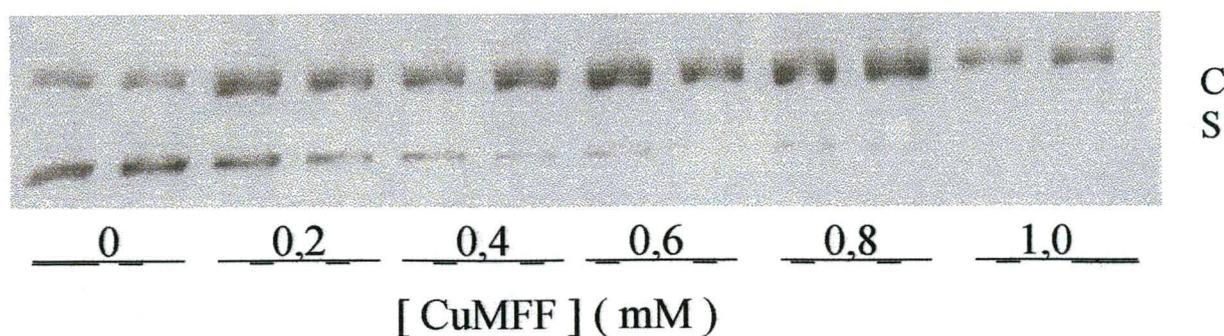


Figura 16 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 50 °C, pH 7,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF. Na figura S representa a forma plasmidial superenovelada e C a forma circular relaxada.

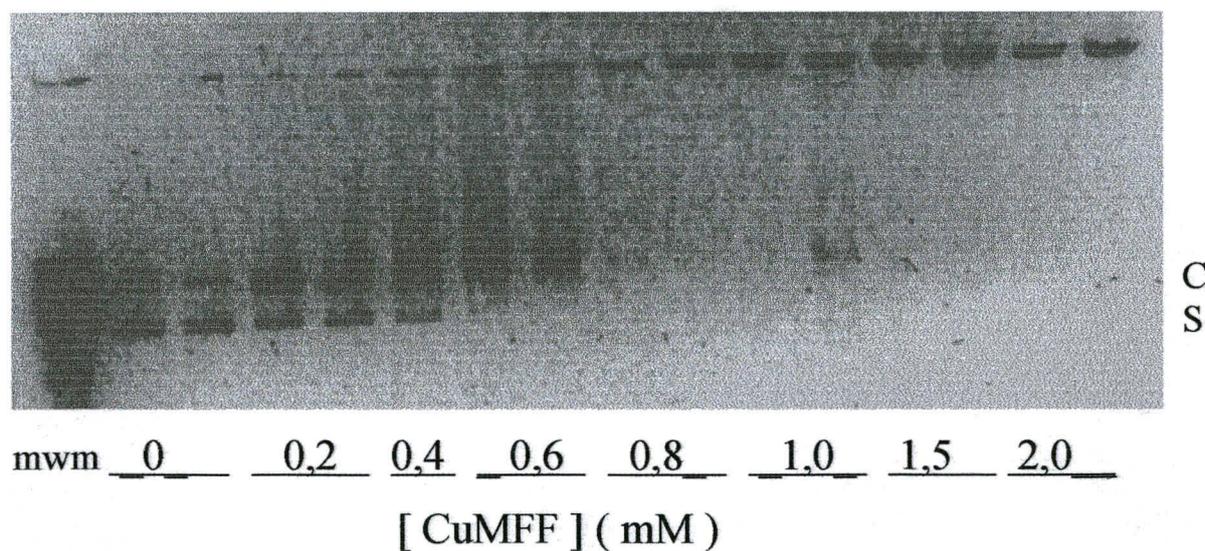


Figura 17 - Clivagem de pSG-Nor-1 a temperatura de 50 °C, pH 9,0, 24 horas de incubação e concentrações variáveis de CuMFF. Na figura S representa a forma plasmidial superenovelada e C a forma circular relaxada.

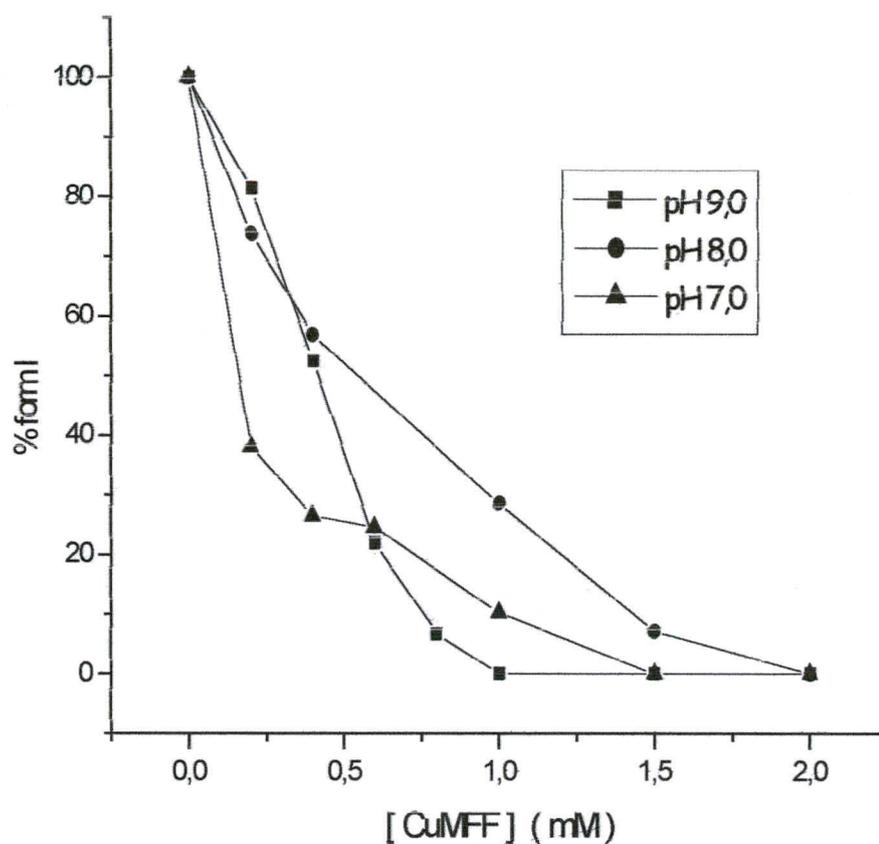


Figura 18 - Quantificação das fotos representadas nas figuras 13, 16 e 17. Porcentagem da forma I (superenovelada) em função da concentração de CuMFF nos pH 7,0, 8,0 e 9,0. Os valores representam as médias das duplicatas obtidas. O 100 % é dado pela intensidade da forma superenovelada à concentração de CuMFF zero.

4.3 Dependência da clivagem de DNA com a força iônica.

As figuras 19 e 20 representam a clivagem do DNA obtida na concentração de CuMFF igual a 1 mM e a força iônica crescente.

Observa-se um efeito salino negativo (isto é, um decréscimo na velocidade da reação com o aumento da concentração salina) indicando que os reagentes envolvidos no estado de transição possuem sinais opostos.⁵⁷ Esta interpretação é coerente ao lembrarmos da molécula de DNA, negativamente carregada, e do complexo metálico em questão, este positivamente carregado.

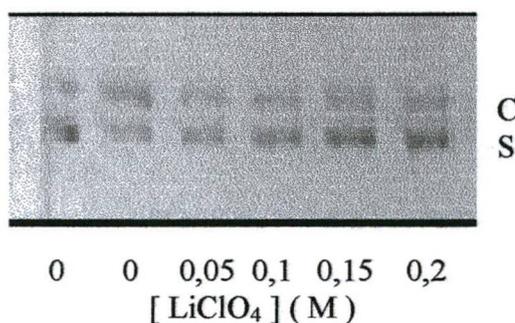


Figura 19 - Clivagem de pSG-Nor-1 a pH 8,0, temperatura de 50 °C, força iônica variável (LiClO_4) e 24 horas com CuMFF 1 mM (exceto para a primeira banda onde a concentração de CuMFF é igual a zero). A concentração de LiClO_4 é mostrada na figura.

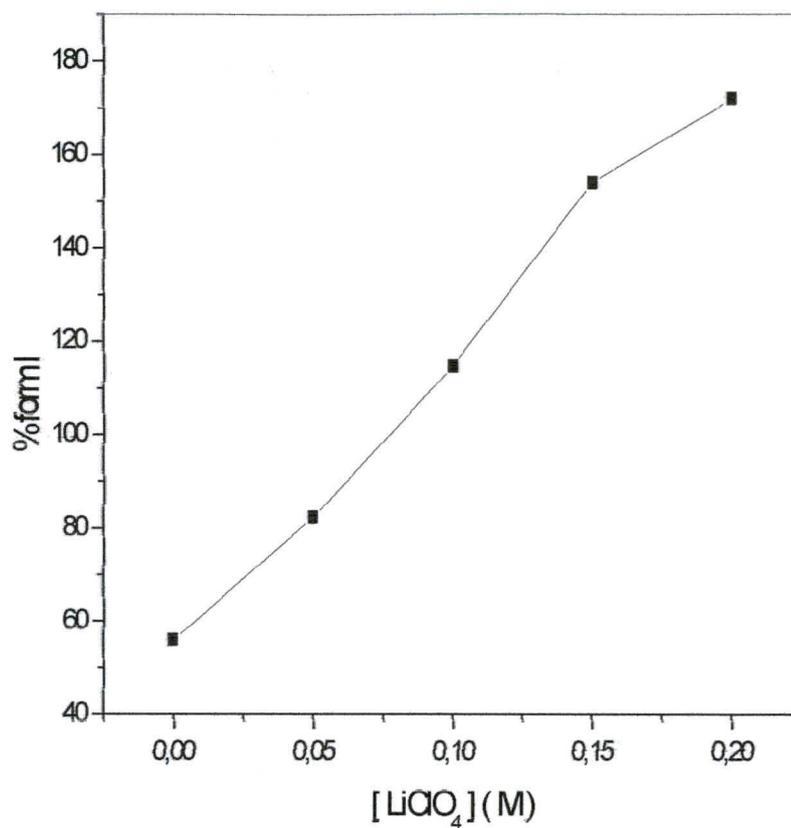


Figura 20 – Quantificação da foto representada na figura 19. Porcentagem de forma I (superenovelada) em função da força iônica dada por LiClO_4 . O 100% é dado pela somatória das formas superenovelada e circular na amostra em que a concentração de CuMFF e a força iônica são iguais a zero.

4.4 Efeito de Captadores de Radicais livres na clivagem de DNA.

Muitos dos complexos metálicos conhecidos clivam o DNA via um mecanismo oxidativo no qual radicais hidroxil são produzidos. Captadores de radicais livres como DMSO e glicerol são, então, importantes ferramentas para se determinar se uma nuclease química cliva o DNA via um mecanismo de reação oxidativo ou hidrolítico. Se a adição do captador de radicais livres inibir a reação de clivagem do DNA pela nuclease química, significa que radicais livres difusos estão presentes e que portanto o mecanismo de reação é oxidativo naquelas condições em que o experimento foi realizado. Do contrário haverá, então, fortes indícios para um mecanismo hidrolítico. Há algumas substâncias, como por exemplo a Bleomicina^{59,60} (um antibiótico antitumoral), que apesar de reagirem por um mecanismo oxidativo não produzem radicais livres hidroxil. Para essa nuclease química a adição de captadores de radicais livres não inibe a reação de clivagem do DNA.

A figura 21 A e B mostra o perfil de clivagem obtido por CuMFF sobre o DNA a 50 °C, pH 8,0 por 24 h com e sem a adição de Glicerol e DMSO respectivamente

As figuras 22 e 23 representam quantitativamente os resultados da figura 21 A e B.

Observa-se que esses captadores de radicais livres não inibem a clivagem do DNA por CuMFF. Isso é um forte indício para um mecanismo hidrolítico de CuMFF sobre o DNA. Apesar de não podermos descartar a possibilidade de um mecanismo oxidativo, pode-se afirmar que radicais livres difusos não estão envolvidos no mecanismo de reação.

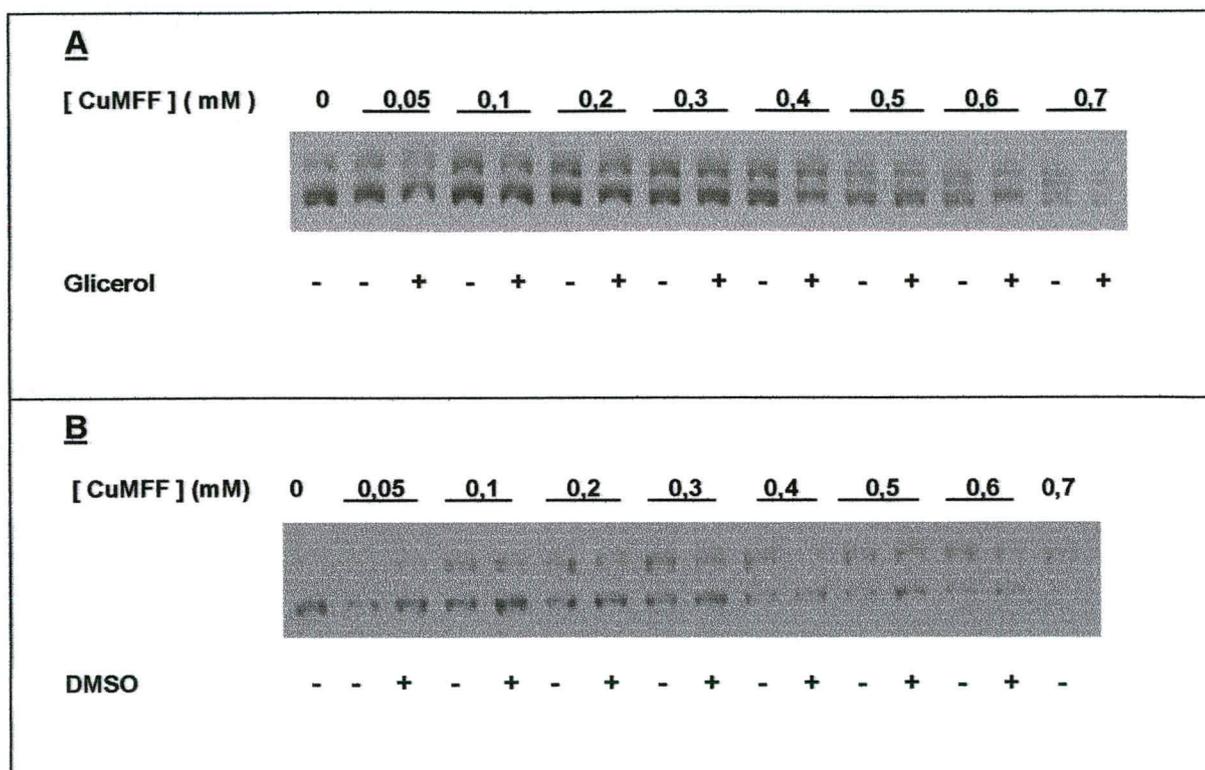


Figura 21 – Clivagem de pSG-Nor-1 com e sem a adição de glicerol (A) e DMSO (B) na concentração de 400 mM. Os sinais positivos e os negativos indicam a presença e a ausência respectivamente dos captadores de radicais livres. A reação foi feita a pH 8,0, 50 °C, 24 horas de incubação e com concentrações variáveis do complexo CuMFF conforme indicado na figura.

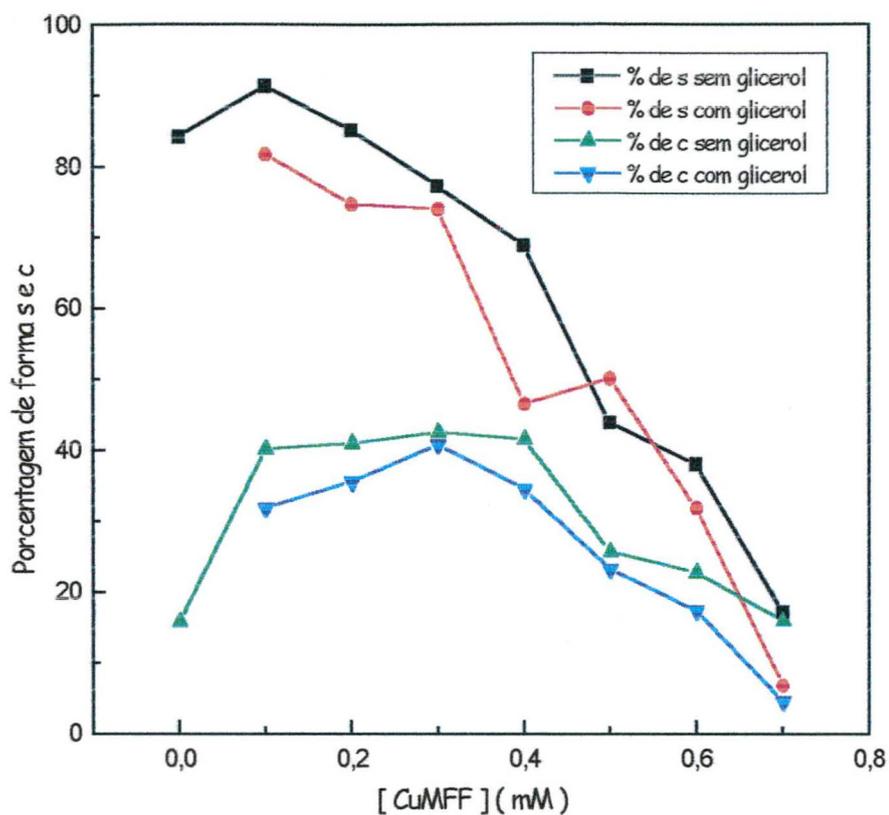


Figura 22 - Quantificação da foto representadas na figura 21 A. Porcentagem da forma s (superenovelada) e c (circular) com e sem a adição de Glicerol em função da concentração de CuMFF. Os valores representam a média das duplicatas obtidas. O 100 % é dado pela somatória das intensidades das formas superenovelada e circular na concentração de CuMFF igual a zero.

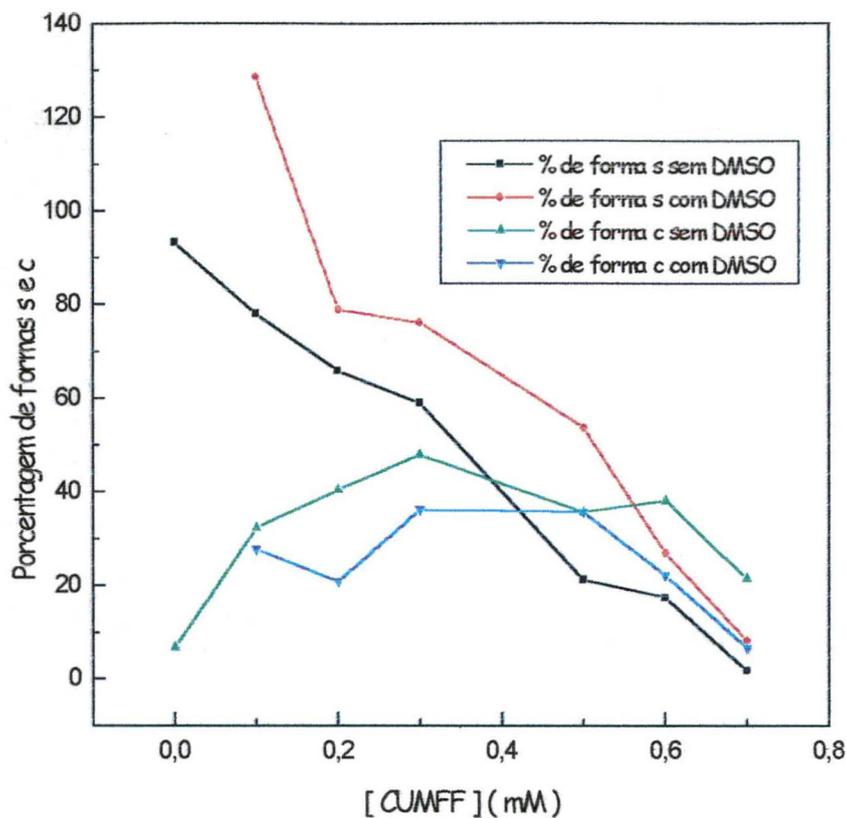


Figura 23 - Quantificação da foto representadas na figura 21 B. Porcentagem da forma s (superenovelada) e c (circular) com e sem a adição de DMSO em função da concentração de CuMFF. Os valores representam a média das duplicatas obtidas. O 100 % é dado pela somatória das intensidades das formas superenovelada e circular na concentração de CuMFF igual a zero.

4.5 Espectrofotometria da interação DNA – CuMFF.

Tem sido reportado ⁶¹ que a adição de DNA dupla fita em solução aquosa de vários complexos metálicos intercalantes causa a emissão de fluorescência ou ainda a variação na intensidade de absorção em algum comprimento de onda do UV-VIS.

Com o intuito de verificar se CuMFF tratava-se de um complexo metálico intercalante fez-se medidas de absorção, na região UV-VIS, antes e após a adição de DNA plasmidial monitorando-se a banda exibida por CuMFF a 408 nm. (Qualquer variação nas bandas de absorção de CuMFF na região do ultravioleta seriam encobertas devido a forte absorção do DNA e ribonucleotídeos nessa região).

Constatou-se, como mostrado na figura 24, que não houve variação na absorção daquela banda, o que nos leva a supor que CuMFF não é um complexo metálico que intercala na dupla hélice de DNA.

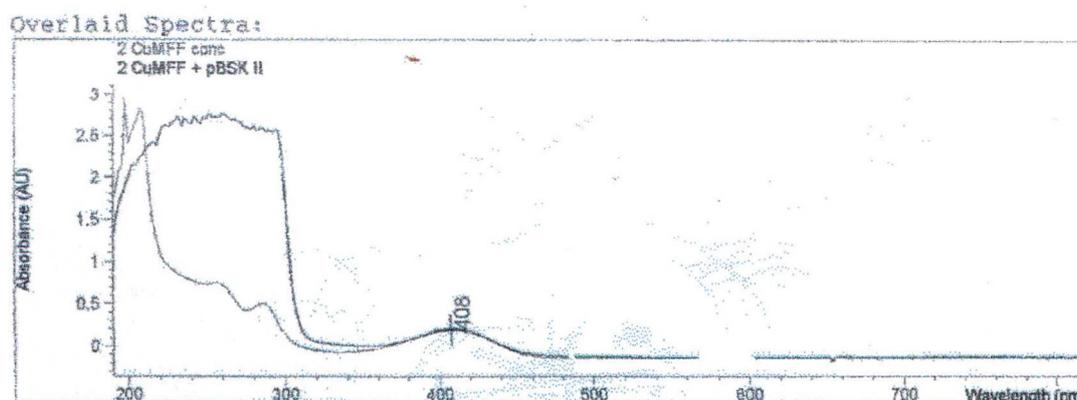


Figura 24 - Espectro no UV-VIS de CuMFF (pH 8) com adição de pBSK-II. A banda em 408 nm não é alterada com a adição do plasmídeo.

Com o objetivo de se verificar se CuMFF permanecia de alguma forma ligado a dupla hélice de DNA, isolou-se o DNA plasmidial (previamente exposto a ação de CuMFF a pH 8,0, 50 °C e 24 horas de incubação) e fez-se medidas no UV – VIS. Não observou-se a banda em torno de 400 nm típica de CuMFF a pH 8,0. Isso indica que não há CuMFF ligado a dupla hélice de DNA, ao menos na quantidade que possa ser observado na faixa de limite de detecção do espectrofotômetro.

4.6 Medidas Cinéticas para a clivagem do DNA por CuMFF.

A velocidade de clivagem de DNA foi monitorada a várias concentrações de CuMFF, a pH 8,0 e 50 °C e os perfis dos géis obtidos são mostrados nas figuras 25 a 36.

Os resultados obtidos a para as concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM de CuMFF (≥ 10 vezes a concentração de ligações fosfato) foram tratadas matematicamente para o cálculo do k_{obs} . Considerou-se que na reação somente a concentração do DNA superrenovelado muda apreciavelmente com o tempo (como demonstrado no experimento discutido anteriormente CuMFF não permanece ligado ao DNA após a reação de clivagem). O plote do logaritmo natural da intensidade da forma superrenovelada (proporcional à concentração da mesma) em um determinado tempo dividida pela intensidade da forma superrenovelada no tempo inicial ($\ln S / S_0$) em função do tempo mostra-se linear o que é indicativo de uma reação de pseudo-primeira ordem com relação ao DNA, sendo o coeficiente angular k_{obs} , a constante de velocidade observada de primeira ordem (figura 37 e tabela 1).

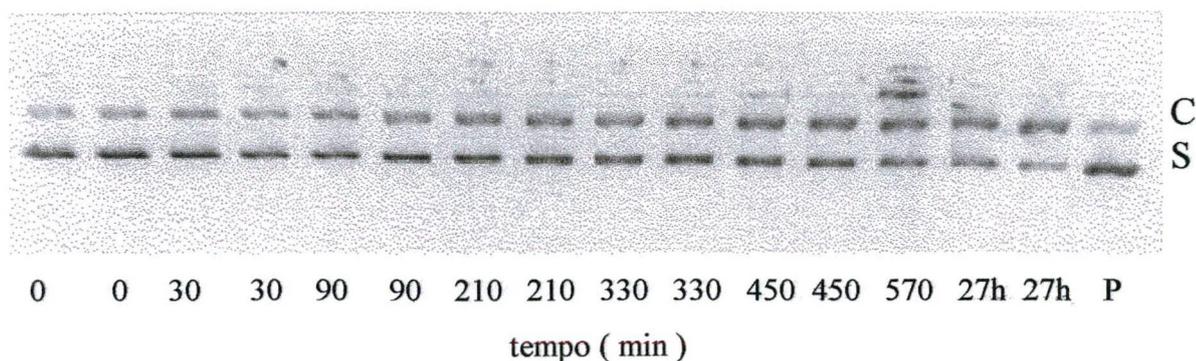


Figura 25 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 0,4 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura. A última banda representa o plasmídeo puro.

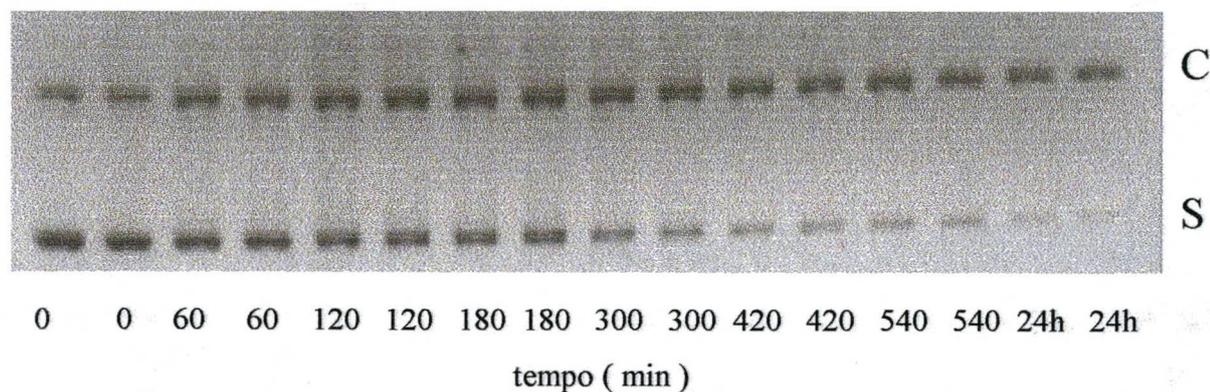


Figura 26 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 0,7 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

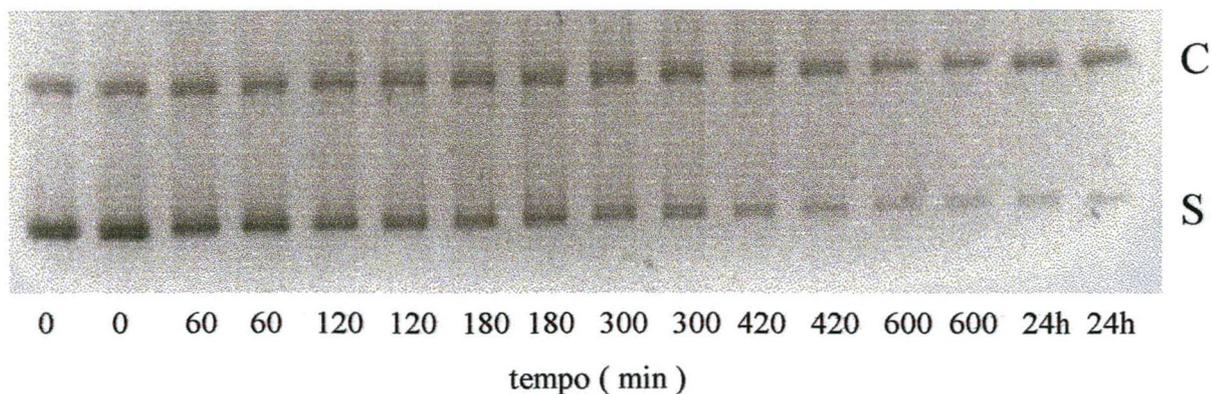


Figura 27 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 1 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

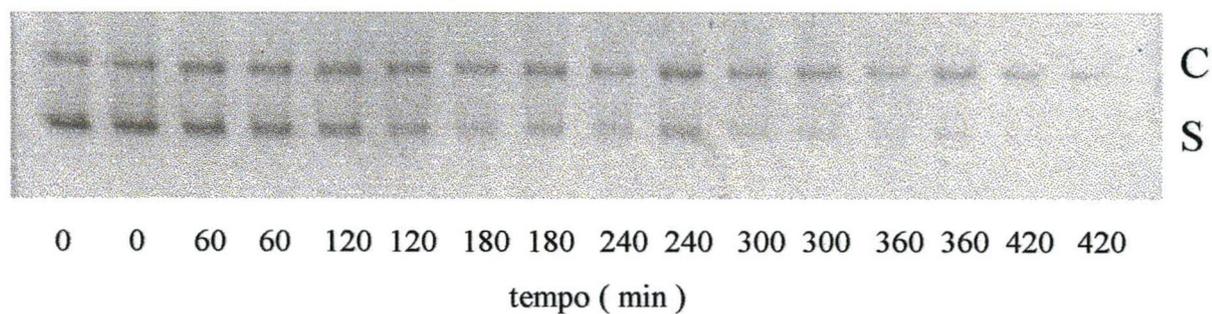


Figura 28 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 1,5 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

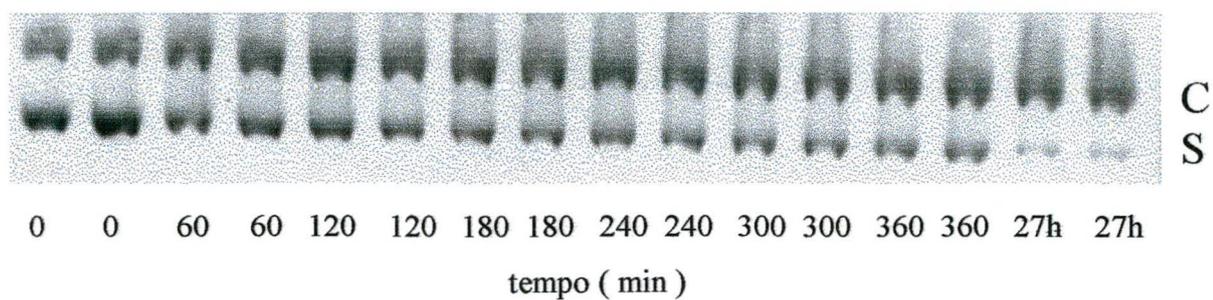


Figura 29 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 1,5 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

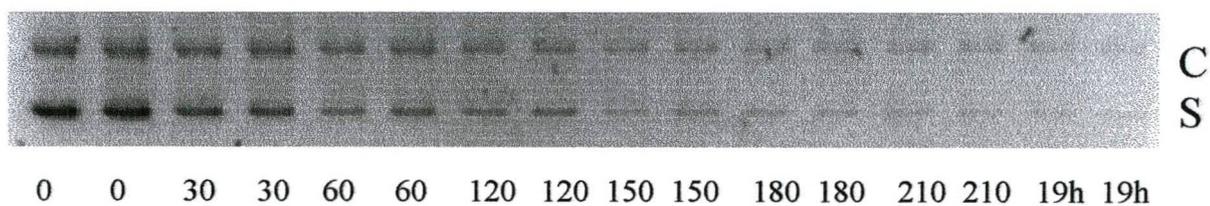


Figura 30 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 2,0 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

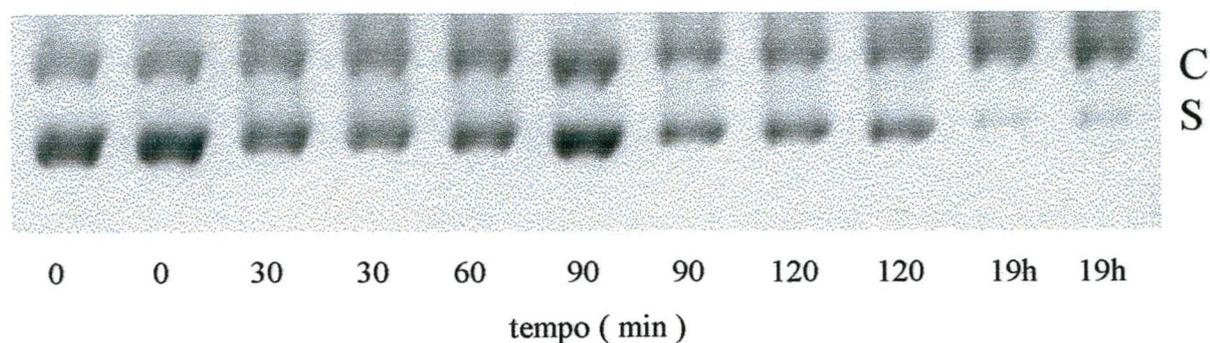


Figura 31 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 2,0 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

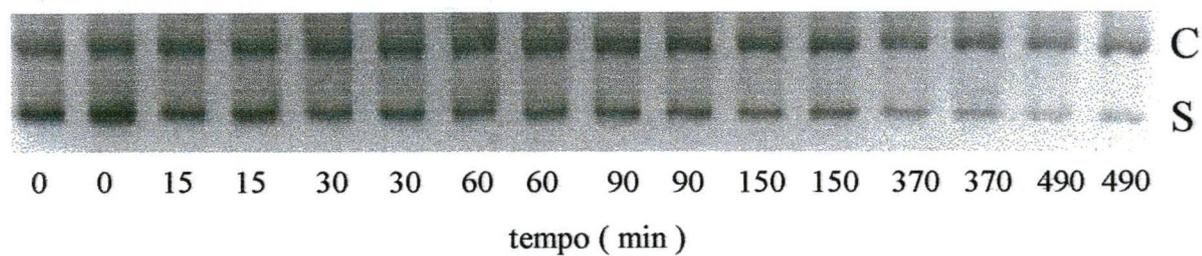


Figura 32 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 2,5 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

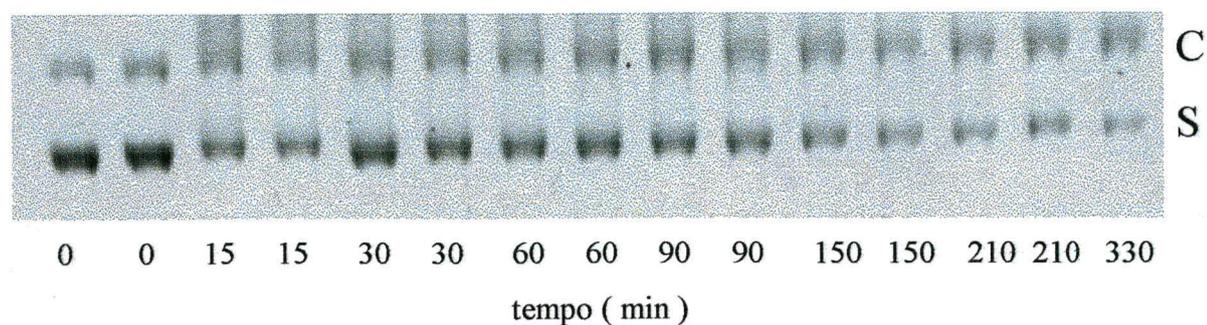


Figura 33 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 2,5 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

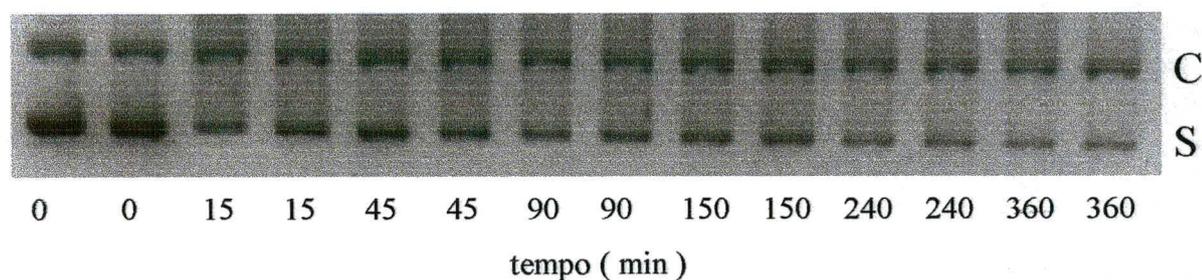


Figura 34 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 2,8 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

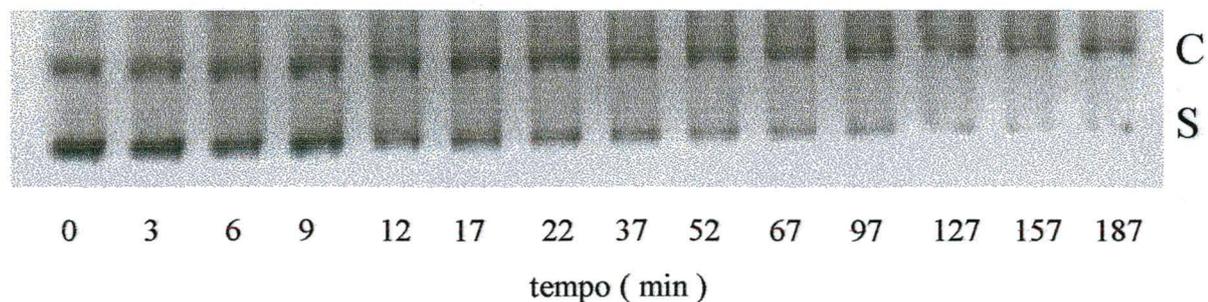


Figura 35 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 3,0 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

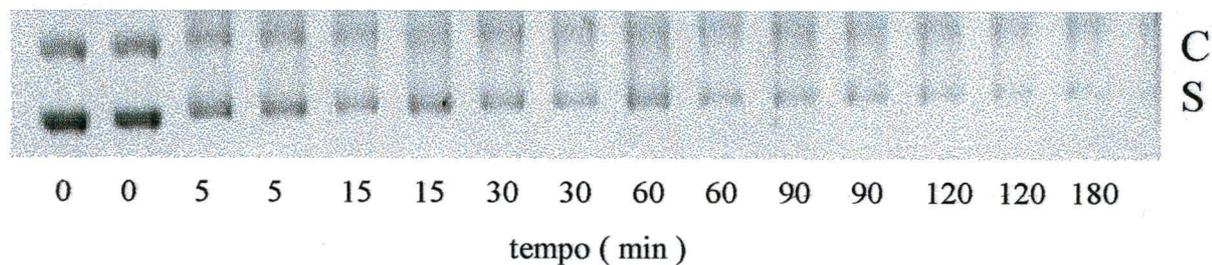


Figura 36 - Cinética de clivagem de pSG-Nor-1 a concentração de CuMFF igual a 3,0 mM. As amostras foram coletadas nos tempos indicados na figura.

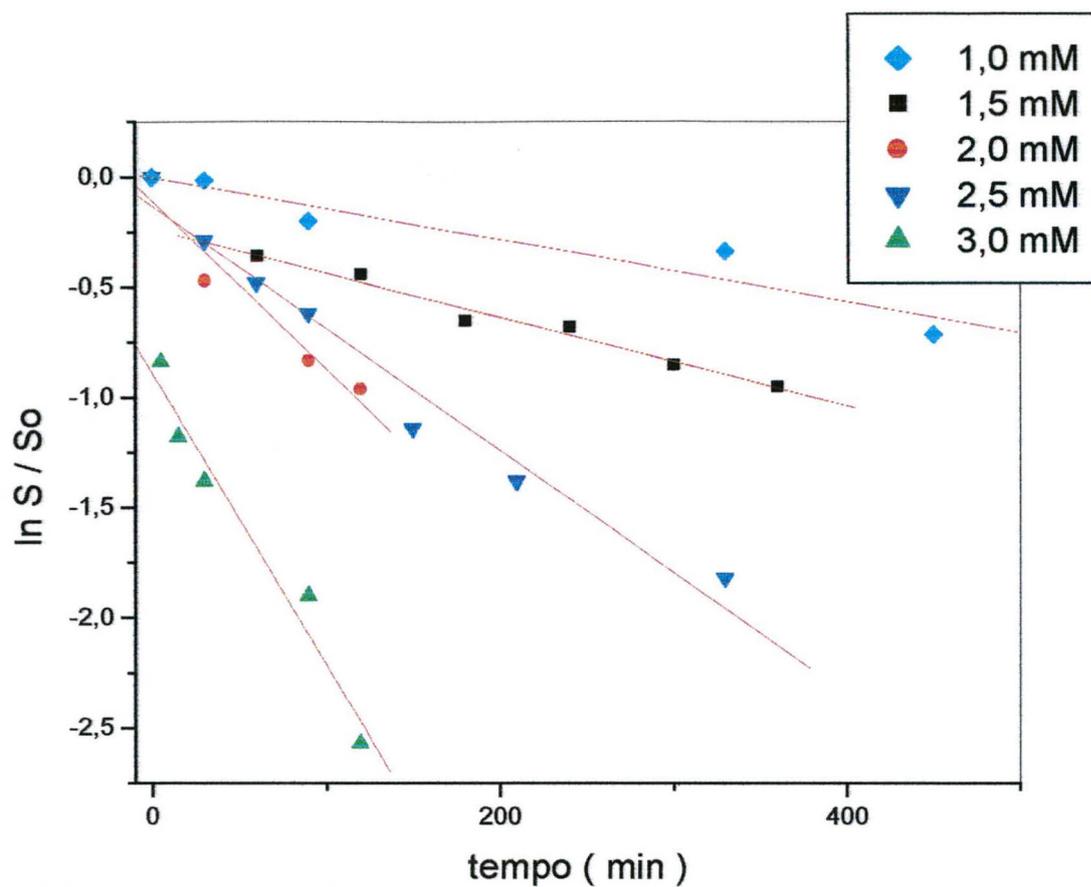


Figura 37 - Logarítimo natural da intensidade da forma superrenovelada no tempo t (S) sobre a intensidade da forma superrenovelada no tempo inicial (S_0) em função do tempo para várias concentrações de CuMFF.

Tabela 1 – Valores de K_{obs} obtidos a partir da figura 37.

[CuMFF]	K_{obs} (min^{-1})
1,0 mM	0,00084
1,5 mM	0,00133
2,0 mM	0,00209
2,5 mM	0,00553
3,0 mM	0,01301

Como dito anteriormente o tempo de meia vida para a clivagem das ligações fosfodiéster no DNA é estimado na ordem de 200 milhões de anos (pH 7.0, 25°C) enquanto que exposto a 2 mM de CuMFF, pH 8,0 e 50 °C o tempo de meia vida é de apenas 80 min. Já a constante de velocidade para a hidrólise de uma dupla fita de DNA sob condições fisiológicas é estimada⁶² ser da ordem de $6 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$ enquanto nas condições descritas anteriormente e a concentração de 3 mM, CuMFF apresenta uma constante de velocidade observada de $1,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ acelerando a reação por um fator maior que 10^7 vezes o que demonstra a grande habilidade de CuMFF catalisar a hidrólise do DNA.

Na tabela 2 faz-se a comparação das constantes de velocidade obtidas para vários complexos metálicos e enzimas com o complexo CuMFF. Estes resultados foram obtidos sob falsas condições de Michaelis – Menten (reações com excesso da concentração do complexo metálico sob a concentração do DNA)²³ no nível de saturação (isto é, na velocidade máxima)

Complexo	kobs (h ⁻¹)
(Pr ³⁺) ₂ -ionophore	0,90
Cu(9 ^a neN ₃)	~0,04
Eu ³⁺	0,25
Eu ³⁺ -ionophore	2,10
Co ³⁺ -cyclen	0,79
Co ³⁺ -tamen	0,18
Rh-P-Zn	0,09
Cu-neamina	1,86
Gd-aza crown	0,27
CuMFF*	0,78
Mg-MutT dGTPase	1,44x10 ⁴
Mg-EcoRV	43,2
Mn-EcoRV	54

Tabela 2 – Valores de kobs para vários complexos e enzimas.²³

* Complexo analisado neste trabalho

4.7 Determinação do tipo de clivagem exibido por CuMFF

Com o intuito de determinar se a clivagem realizada por CuMFF ocorria especificamente (em determinada sequencia de pares de bases) ou de forma randômica, fez-se experimentos de sequenciamento utilizando-se uma modificação do Método de Sanger.

A figura 38 é uma foto do gel de sequenciamento obtido, após revelação com prata. As bandas A, B, C e D representam o sequenciamento obtido para o pSG-Nor-1 utilizando-se os quatro desoxiribonucleosídeos G, A, T e C respectivamente. As bandas E, F e G representam o sequenciamento obtido para o pSG-Nor -1 previamente tratado com 0 mM, 8 mM e 10 mM de CuMFF respectivamente, com posterior purificação, sem a adição dos quatro desoxiribonucleosídeos (o bloqueamento do crescimento da cadeia é feita por um corte na cadeia complementar devido a ação de CuMFF). As bandas H, I, J e K bem como as bandas M, N O e P representam o sequenciamento, com a adição dos desoxiribonucleosídeos, obtido para o pSG- Nor- 1 previamente tratado com 8mM e 10 mM de CuMFF respectivamente. A banda L é simplesmente uma amostra de pSG- Nor -1 submetida aos mesmos ciclos de aquecimento e resfriamento da reação de sequenciamento.

Os resultados obtidos (figura 38, bandas H,I,J,K,M,N,O e P) mostram que a reação de sequenciamento ocorre e que portanto não resta contaminação por CuMFF na reação de sequenciamento (o mesmo degrada a enzima Taq polimerase), graças a purificação do pSG- Nor-1 previamente tratado com CuMFF.

Os resultados ainda mostram que o plasmídeo não apresenta a formação de bandas de peso molecular específico devido ao tratamento com CuMFF (bandas F e G) o que nos leva a concluir que CuMFF não exhibe um padrão de clivagem específico e que portanto esse reage de forma randômica sobre a dupla hélice de DNA.

A B C D E F G H I J K L M N O P

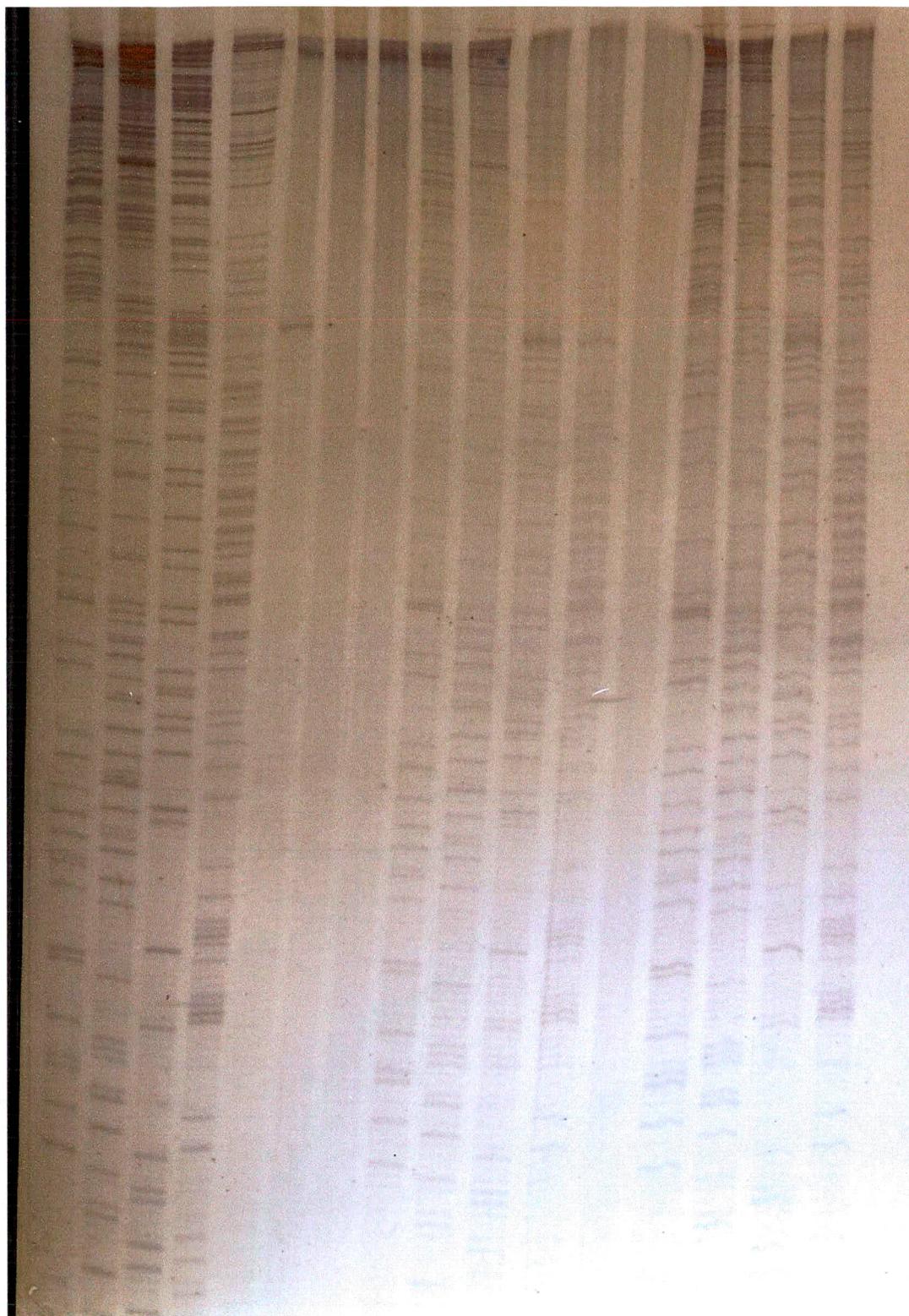


Figura 38 - Gel obtido para o sequenciamento de pSG-Nor-1 previamente tratado com CuMFF.

5 CONCLUSÕES

O complexo de coordenação $[\text{Cu} (\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]$ (CuMFF) desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Ademir Neves é capaz de clivar o DNA dupla fita, circular e na forma B. A clivagem do DNA exibida por CuMFF é consideravelmente sensível a temperatura, pH, força iônica e tempo de reação.

A 37 °C e a 2 mM de CuMFF, a forma superenovelada é quase totalmente transformada em forma circular ou degradada enquanto a 50 °C, nessa mesma concentração, o DNA é totalmente degradado evidenciando a forte dependência reacional com a temperatura.

Nos testes com controle de força iônica observa-se um efeito salino negativo indicando que os reagentes envolvidos no estado de transição possuem sinais opostos.

Os resultados obtidos para a reação de CuMFF com pSG-Nor-1 com a adição de captadores de radicais livres não descartam a possibilidade de um mecanismo oxidativo mas sugerem que radicais livres difusos não estão envolvidos no mecanismo de reação.

Nos estudos cinéticos obteve-se valores de k_{obs} que ficaram na faixa de 0,00084 a 0,01301 min^{-1} para as concentrações de CuMFF variando de 1,0 a 3,0 mM o que indica um grande aumento na velocidade da reação com o aumento da concentração de CuMFF.

Nos experimentos de sequenciamento os resultados mostram que o plasmídeo não apresenta a formação de bandas de peso molecular específico após o tratamento com CuMFF o que nos leva a concluir que CuMFF exibe um padrão de clivagem aleatório sobre a dupla hélice de DNA.

6 REFERÊNCIAS

1 – DIMROTH, K.; WITZEL, H.; HULSEN, W. et al. Über die hydrolyse von ribonucleinsäuren in gegenwart von metallhydroxyden. **Annalen Der Chemie-Justus Liebig**, v. 620, p. 94-08, 1959.

2 – BUTZOW, J. J.; EICHHORN, G. L. Interaction of metal ions with nucleic acids and related compounds .17. mechanism of degradation of polyribonucleotides and oligoribonucleotides by zinc(ii) ions. **Biochemistry**, v. 10, p. 2019-2027, 1971.

3 – ELMROTH, S. K. C.; LIPPARD, S. J. Platinum binding to d(gpg) target sequences and phosphorothioate linkages in dna occurs more rapidly with increasing oligonucleotide length. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, p. 3633-3634, 1994.

4 – SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A; PERRIN, D. M. Chemical Nucleases **Chem. Rev.**, v. 93, p. 2295-2316, 1993.

5 – DERVAN, P. B. Reagents for the site-specific cleavage of megabase DNA. **Nature**, v. 359, p. 87-88, 1992.

6 – BARTON, J. K. Metals and DNA - molecular left-handed complements. **Science**, v. 233, p. 727-734, 1986.

7 – PELCZAR, M. J. Jr; KRIEG, R. N.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia – Conceitos e aplicações v. 1. 2^a ed.** São Paulo: Makron Books,1997, p. 76-78.

8 – STRYER, L. **Bioquímica**. Volume único. Quarta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan editora, 1996.

9 – HOLM, R. H.; SOLOMON, E. I. Bioinorganic enzymology – Preface. **Chemical reviews**, v. 7, p. 2237, 1996.

10 – SADLER, P. J. Inorganic-chemistry and drug design. **Adv. Inorg. Chem.**, v. 36, p. 1-48, 1991.

11 – ORVIG, C.; ABRAMS M. J. Medicinal inorganic chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**, v.99, p. 2201-2203, 1999.

12 – JURISSON, S. S.; LYDON J. D. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. **Medicinal Inorganic Chemistry, Chemical Reviews**, v. 99, p. 2205-2218, 1999.

13 – WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Medicinal Inorganic Chemistry, Chemical Reviews**, v. 99, p. 2451-2466, 1999.

14 – SHAW III, C. F. Gold-based therapeutic agents. **Medicinal Inorganic Chemistry, Chemical Reviews**, v.99, p. 2589-2600, 1999.

15 – SIGMAN, D. S. Chemical nucleases. **Biochemistry**, v. 29, p. 9097-9105, 1990.

16 – CHAND, D. K.; SCHNEIDER, H.; AGUILAR, J. A. et al. Copper complexes of polyaza[n]cyclophanes and their interaction with DNA and RNA. **Inorganic Chimica Acta**, v. 316, p. 71-78, 2001.

17 – ROIGK, A.; HETTICH, R.; SCHENIEDER, H. Unusual catalyst concentration effects in the hydrolysis of phenyl phosphate esters and of DNA: A systematic investigation of the lanthanide series. **Inorg. Chem.** V. 37, p. 751-756, 1998.

18 – ZHU, B.; ZHAO D. K.; NI, J. et al. Binuclear lanthanide complexes as catalysts for the hydrolysis of double-stranded DNA. **Inorg. Chem. Communications**, v. 2, p. 351-353, 1999.

19 – CHEN, F.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y. et al. Metal-mediated oxidative DNA damage induced by nitro-2-aminophenols. **Câncer Letters**, v. 126, p. 67-74, 1998.

20 – (a) RICE, J. A.; CROTHERS, D. M.; PINTO, A. L. at al. The major adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(ii) with dna bends the duplex by almost-equal-to-40-degrees toward the major groove, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 4158, 1988. (b) PIL, P. M.; LIPPARD, S. J. Specific binding of chromosomal protein-hmg1 to dna damaged by the anticancer drug cisplatin. **Science**, v. 256, p. 234, 1992.

21 – Westheimer, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**, v. 235, p. 1173-1178, 1987.

22 – SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 6, p. 337-347, 2001.

23 - SREEDHARA, A.; COWAN, J. A.; FREED, J. D. Efficient inorganic deoxyribonucleases. Greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 122, p. 8814-8824, 2000.

24 – DIXON, N. E.; GEUE, R. J.; LAMBERT, J. N. et al. DNA hydrolysis by stable metal complexes. **Chem. Communications**, v. 11, p. 1287-1288, 1996.

25 – BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 1109, 1998.

26 – POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. Oxidative strand scission of nucleic acids: Routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. **RNA/DNA Cleavage – Chemical Reviews**, v. 98, p. 1089-1107, 1998.

27 – (1) PRATVIEL, G.; DUARTE, V.; BERNADON, J. et al. Nonenzymatic cleavage and ligation of dna at a 3 a.t base-pair site - a 2-step pseudohydrolysis of DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 115, p. 7939, 1993. (2) DERVAN, P. B. Design of sequence-specific dna-binding molecules. **Science**, v. 232, p. 464, 1986.

28 – HEGG, E. L.; BURTYN, J. N. Copper(II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. **Inorg. Chem.**, v. 35, p. 7474-7481, 1996.

29 – 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. 1089-1107, 1998.

30 – (1) DIXON, W. J.; HAYES, J. J.; LEVIN, J. R. et al. Hydroxyl radical footprinting. **Methods Enzymol.**, v. 208, p. 380-403, 1991. (2) POGOZELSKI, W. K.; MCNEESE, T. J.; TULLIUS, T. D. What species is responsible for strand scission in the reaction of [fe(ii)edta](2-) and H₂O₂ with DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 6428-6433, 1995.

31 – SIGMAN, D. S.; CHEN, C. B. Chemical nucleases - new reagents in molecular-biology. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 59 p. 207-236, 1990.

32 – (1) STUBBE, J.; KOZARICH, J. W. Cohen, S. S. In bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects. **Chem. Rev.**, v. 87, p. 267-286, 1979.

33 – DEAL, K. A.; HENGGE, A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, p. 1713-1718, 1996.

34 – SCHNAITH, L. M.; HANSON, R. S.; QUE, L. J. Double-stranded cleavage of pbr322 by a diiron complex via a hydrolytic mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 569-573, 1994.

35 – (1) YASHIRO, M.; ISHIKUBO, A.; KOMIYAMA, M. Preparation and study of dinuclear zinc(ii) complex for the efficient hydrolysis of the phosphodiester linkage in a diribonucleotide. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, p. 1793, 1995. (2) SHIHOZUKA, K.; SHIMIZU, K.; NAKASHIMA, Y. et al. Synthesis and RNA cleaving activities of polyamine derived novel artificial ribonuclease **Bioorg. Méd. Chem. Lett.**, v, 4, p. 1979. 1994.

36 – ZHU, B.; ZHAO, D.; NI, J. et al. Binuclear lanthanide complexes as catalysts for the hydrolysis of double-stranded DNA. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 2, p. 351-353, 1999.

37 – LERMAN, L. S. Structural considerations in interaction of dna and acridines. **J. Mol. Biol.**, v. 3, p. 18, 1961.

38 – ERKKIBA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2777-2795, 1999.

39 – BARTON, J. K.; DANNENBERG, J. J.; RAPHAEL, A. L. Enantiomeric selectivity in binding tris(phenanthroline)zinc(ii) to DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 104, p. 4967, 1982.

40 – RECHMANN, J. P.; BARTON, J. K. H-1-nmr studies of tris(phenanthroline) metal-complexes bound to oligonucleotides - characterization of binding modes. **Biochemistry.**, v. 29, p. 1701, 1990.

41 – ARMITAGE, B. Photocleavage of nucleic acids. **Chem Rev.**, v. 98, p. 1171-1200, 1998.

42 – NIELSEN, P. E.; JEPPESEN, C.; BUCHARDT, O. Uranyl salts as photochemical agents for cleavage of dna and probing of protein-DNA contacts. **FEBS Lett.**, v. 235, p. 122, 1988.

43 – CHOW, C. S.; BARTON, J. K. Transition-metal complexes as probes of nucleic-acids. **Methods Enzymol.**, v. 212, p. 219-242, 1992.

44 – VESAWA, Y.; KUWAHARA, J.; SUGIURA, Y. Light-induced DNA cleavage by esperamicin and neocarzinostatin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 164, p. 903-911, 1989.

45 – PROMEGA. **Silver Sequence DNA Sequencing System. Instructions for use of Products Q4130 qnd Q4131.**

46 – AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTOM, R. E. et al. **Short Protocols in Molecular Biology.** 3^a. edição. EUA: Wiley, 1993.

47 – LANZMASTER, M.; NEVES, A. **24^a Reunião Anual da SBQ, QI 83,** 2001.

48 – UOZUMI, S., FURUTACHI, H., OHBA, M. et al. Dinuclear nickel (II) complexes of an unsymmetric, “end-off” compartmental ligand: conversion of urea into cyanate at a dinuclear nickel core. **Inorganic Chemistry**, v. 37, p. 6281-6287, 1998.

49 – PRITZKOW, H.; HUTTER, G. **ZORTEP. An Interactive Ortep Program University of Heidelberg, Germany, 1996.**

50 – SCARPELLINI, M. **Síntese, caracterização e reatividade de novos complexos de Ferro e de Cobre com ligantes imidazólicos de relevância bioinorgânica.** Florianópolis, 2001. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

51 – WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in Practice.** 2^a. edição. Alemanha: VCH, 1997.

52 – GIBCO BRL Products – Life Technologies. **Concert High Purity Plasmid Purification Systems – Concert High Purity Plasmid Maxiprep System.**

53 – DONG, G.; ZEIKUS, J. G. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Thermotoga neapolitana*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 335-340, 1997

54 – GIBCO BRL Products - Life Technologies. **Concert Rapid Gel Extraction Systems.**

55 – GIBCO BRL Products – Life Technologies. **Concert Rapid PCR purification System.**

56 – DEAL, K. A.; HENGGE, A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, p. 1713-1718, 1996.

57 – WILKINS, R. G. **Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes.** 2^a edição. New York.1991

58 – (a) STUBBE, J.; KOZARICH, J. W. Mechanisms of bleomycin-induced dna-degradation. **Chem. Rev.**, v. 87, p. 1107-1136, 1987.

59 – RABOW, L. E.; MCGALL, G. H.; STUBBE, J. et al. Identification of the source of oxygen in the alkaline-labile product accompanying cytosine release during bleomycin-mediated oxidative-degradation of d(CGCGCG). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 112, p. 3203-3208, 1990.

60 – (a) HECHT, S. M. The chemistry of activated bleomycin. **Acc. Chem. Res.**, v. 19, p. 383-391, 1986.

61 – ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. **Chemical Reviews – Medicinal Inorganic Chemistry**, v. 99, p. 2777 – 2795, 1999.

62 – CHIN, J.; BANASZCZYK, M.; JUBIAN, V. et al. Co(iii) complex promoted hydrolysis of phosphate diesters - comparison in reactivity of rigid cis-diaquotetraazacobalt(iii) complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 186-190, 1989.