



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Larissa Fernanda Borges de Oliveira

**Análise Biofísica da Interação entre Grb2 e DNA G-quadruplex e seu Domínio
SH2 com as Moléculas Cumarina e Morina**

São José do Rio Preto

2023

Larissa Fernanda Borges de Oliveira

**Análise Biofísica da Interação entre Grb2 e DNA G-quadruplex e seu Domínio
SH2 com as Moléculas Cumarina e Morina**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 15621/2021-1

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

São José do Rio Preto

2023

O48a

Oliveira, Larissa Fernanda Borges de

Análise biofísica da interação entre Grb2 e DNA G-quadruplex e seu domínio SH2 com as moléculas cumarina e morina / Larissa Fernanda Borges de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2024

75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Fernando Alves de Melo

1. Biofísica molecular. 2. Proteínas. 3. Espectroscopia de fluorescência. 4. Dicroísmo circular. 5. Calorimetria diferencial de varredura. I. Título.

Larissa Fernanda Borges de Oliveira

**Análise Biofísica da Interação entre Grb2 e DNA G-quadruplex e seu Domínio
SH2 com as Moléculas Cumarina e Morina**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 15621/2021-1

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

UNESP – São José do Rio Preto – SP

Orientador

Prof. Dr. Luis Felipe Santos Mendes

USP – São Carlos – SP

Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

UNESP – São José do Rio Preto – SP

São José do Rio Preto

14 de Dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho simboliza não apenas o fim de uma etapa em minha jornada acadêmica, mas também a realização de um sonho pessoal muito importante. Gostaria, neste momento, de expressar minha imensa gratidão a todos que, de alguma forma, apoiaram e tornaram possível a realização deste projeto.

Sou grata ao meu orientador, o Prof. Dr. Fernando Alves de Melo, cujo apoio e dedicação foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Seu tempo, orientação e encorajamento foram inestimáveis.

Além disso, desejo estender meus sinceros agradecimentos a todos que ofereceram sua ajuda, especialmente a você, Renan Pedro. Sua partilha de conhecimento e a amizade que cultivamos foram verdadeiramente inspiradoras. Obrigada por sua paciência e por sempre estender sua mão quando precisei.

As amizades que floresceram ao longo desta jornada têm um lugar especial em meu coração. O carinho e o apoio dado foram um refúgio nos momentos mais desafiadores.

Ao Departamento de Física do IBILCE/UNESP, ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) e a todos os professores e técnicos envolvidos, expresso minha profunda gratidão por suas contribuições que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Sou grata à CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo financiamento que impulsionou o desenvolvimento desta pesquisa.

Também não posso deixar de mencionar minha família, que possibilitou e apoiou minha continuidade neste ciclo de estudos. Obrigada pelo amor incondicional, pela educação e pelos ensinamentos que me tornaram quem sou hoje. Além disso, gostaria de agradecer ao meu amado Matheus Pappi, por ser uma pessoa tão especial em minha vida, que sempre buscou o meu melhor, tanto pessoal quanto profissional.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a Deus por estar sempre comigo, dando-me força, ânimo e fé para nunca desistir e continuar lutando por este sonho e objetivo de vida. Agradeço a Deus por sua graça e por tudo o que Ele fez por mim.

A todos vocês, meu mais profundo e sincero agradecimento.

“[...] Existe em mim uma ousadia que a vontade dos outros é incapaz de intimidar. Nesses momentos, minha coragem não se faz de ignorada”

Jane Austen (1813, p. 132)

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade global, representando um desafio significativo para a saúde pública e a expectativa de vida. As células cancerígenas exibem características biológicas distintas, incluindo a sinalização proliferativa e a instabilidade genômica. Além disso, o desequilíbrio do pH celular favorece a proliferação e a resistência dessas células, facilitando também a sua migração. Proteínas adaptadoras como a Grb2 desempenham um papel importante em vias de sinalização associadas ao câncer, como a via MAPK. Além de mediar a transmissão de sinais a partir de receptores de fatores de crescimento, a Grb2 também está envolvida na regulação de miRNA, na via de reparo de DNA e na regulação da via MAPK por meio do equilíbrio monômero-dímero com a proteína tirosina quinase FGFR2. Considerando a extensa participação da Grb2 nos processos biológicos de uma célula, ela se torna um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias anticarcinogênicas, através de pesquisas com moléculas naturais e até mesmo com estruturas secundárias de DNA. Com isso, parte deste estudo concentrou-se na análise da interação do domínio Grb2-SH2 com moléculas antitumorais, como a cumarina e a morina, em pH 7,0 e 8,0, representativo do pH intracelular de células saudáveis e cancerígenas, respectivamente. Os resultados da interação, investigados por espectroscopia de fluorescência, indicaram uma interação favorável e hidrofóbica ($\Delta G < 0$; ΔH e $\Delta S > 0$), sendo mais favorecida a interação em pH 8,0. Além disso, análises de CD revelaram modificações na estrutura secundária do domínio Grb2-SH2 com o aumento da concentração dos ligantes. Adicionalmente, investigamos a interação da proteína Grb2^{Y160F}, com um tipo de estrutura secundária de DNA, o G-quadruplex, também por meio da espectroscopia de fluorescência. Os resultados demonstram que a variação de entalpia e a variação de entropia são menores que zero ($\Delta H < 0$ e $T\Delta S < 0$), caracterizam que a interação é exotérmica, entropicamente favorecida e espontânea, sendo características típicas de ligações fracas e interações não covalentes, como as forças de van der Waals. Espera-se que este trabalho contribua para base das pesquisas acerca do mecanismo de interação entre diferentes moléculas e proteínas, além de aprimorar novas abordagens terapêuticas e tratamentos mais eficazes no combate ao câncer.

Palavras-chave: Cumarina, DNA G-quadruplex, domínio Grb2-SH2, Grb2, morina.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of global mortality, representing a significant challenge to public health and life expectancy. Cancer cells exhibit distinct biological characteristics, including proliferative signaling and genomic instability. Moreover, the imbalance in cellular pH favors the proliferation, resistance, and migration of these cells. Adaptor proteins such as Grb2 play a crucial role in cancer-associated signaling pathways like the MAPK pathway. Apart from mediating signal transmission from growth factor receptors, Grb2 is also involved in regulating miRNA, DNA repair pathways, and the MAPK pathway by maintaining a monomer-dimer equilibrium with the FGFR2 tyrosine kinase protein. Given Grb2's extensive involvement in a cell's biological processes, it emerges as a promising target for developing anti-cancer therapies through research involving natural molecules and even secondary DNA structures. As such, a portion of this study focused on analyzing the interaction of the Grb2-SH2 domain with anti-tumor molecules, such as coumarin and morin, at pH 7.0 and 8.0, representative of the intracellular pH of healthy and cancerous cells, respectively. Results of the interaction, examined via fluorescence spectroscopy, indicated a favorable and hydrophobic interaction ($\Delta G < 0$; ΔH and $\Delta S > 0$), with the interaction being more favorable at pH 8.0. Additionally, circular dichroism (CD) analyses revealed alterations in the secondary structure of the Grb2-SH2 domain with increasing ligand concentrations. Furthermore, we investigated the interaction of the Grb2^{Y160F} protein with a type of secondary DNA structure, the G-quadruplex, also through fluorescence spectroscopy. The results showed that both enthalpy and entropy variations were less than zero ($\Delta H < 0$ and $T\Delta S < 0$), indicating an exothermic, entropically favored, and spontaneous interaction, typical characteristics of weak bonds and non-covalent interactions like van der Waals forces. It is anticipated that this work will contribute to the foundational understanding of interactions between different molecules and proteins, enhancing new therapeutic approaches and more effective treatments in the fight against cancer.

Keywords: Coumarin, G-quadruplex DNA, Grb2-SH2 domain, Grb2, morin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Estatística dos casos de câncer no Brasil para o triênio de 2023 a 2025 de acordo com o Instituto Nacional de Câncer	1
Figura 1.2: <i>Hallmarks</i> do câncer	2
Figura 1.3: Estrutura em cartoon da proteína adaptadora Grb2 em sua forma monomérica	4
Figura 1.4: Estrutura do domínio SH3c da proteína Grb2	5
Figura 1.5: Representação tridimensional da estrutura do domínio SH2 da proteína Grb2	5
Figura 1.6: Representação da ativação da via de sinalização MAPK	7
Figura 1.7: Esquema proposto para descrever o papel da Grb2 no reparo da DSB	9
Figura 3.1: Representação de um termograma de DSC	13
Figura 3.2: Exemplos de vários espectros de CD de proteínas com diferentes tipos de estrutura secundária	15
Figura 3.3: Diagrama de Jablonski	16
Figura 3.4: Espectro de fluorescência no estado estacionário	17
Figura 4.1: Identificação do sítio de interação d dímero de Grb2 com as moléculas cumarina e morina	23
Figura 4.2: Estrutura do domínio SH2 em um complexo com fosfopeptídeo	24
Figura 4.3: Estrutura da molécula de morina (2',3,4',5,7-pentahidroxifavona)	27
Figura 4.4: Purificação do domínio Grb2-SH2	33
Figura 4.5: Termograma de desnaturação do domínio Grb2-SH2	34
Figura 4.6: Espectro de dicroísmo circular do domínio Grb2-SH2 em pH 7,0 e 8,0	35
Figura 4.7: Espectro de emissão de fluorescência para o complexo SH2-cumarina	36
Figura 4.8: Gráfico comparativo para o complexo SH2-Cumarina em relação ao comprimento de onda máximo (λ_{max}) (círculos verdes) vs o máximo intensidade (I_{max}) (círculos vermelhos) em função do ligante, para ambos pHs	37
Figura 4.9: Espectro de emissão de fluorescência para o complexo SH2-morina	38

Figura 4.10: Gráfico comparativo para o complexo SH2-Morina em relação ao comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max}$) (círculos verdes) vs o máximo intensidade ($I_{\max}$) (círculos vermelhos) em função do ligante, para ambos pHs	38
Figura 4.11: Gráfico de Stern-Volmer	39
Figura 4.12: Gráfico duplo logarítmico	41
Figura 4.13: Gráfico de van't Hoff	42
Figura 4.14: Perfil termodinâmico dos complexos estudados em ambos os pHs	44
Figura 4.15: Espectro de dicroísmo circular do domínio Grb2-SH2 na presença das moléculas cumarina e morina	45
Figura 5.1: Esquema da via de recombinação homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA	49
Figura 5.2: Representação de um DNA G-quadruplex	50
Figura 5.3: Representação das três conformações classificadas como paralelas, antiparalelas e híbridas	51
Figura 5.4: SDS-PAGE a 12% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i>	56
Figura 5.5: Gráfico resultante da análise de dicroísmo circular com amostras do DNA G-quadruplex contendo tampão 100 mM fosfato de potássio pH 7,4	57
Figura 5.6: Análise do espectro de fluorescência da proteína Grb2 ^{Y160F} com DNA G-quadruplex de 14 e 18 nT	57
Figura 5.7: Gráfico de Stern-Volmer para a interação Grb2 ^{Y160F} com os DNAs 14 e 18 nT	58
Figura 5.8: Gráfico de duplo-log para a supressão de fluorescência da Grb ^{Y160F} pelo DNA. Nos insertos de cada gráfico de duplo-log está o gráfico de van't Hoff	59
Figura 5.9: Perfil termodinâmico da Grb ^{Y160F} com os DNAs	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Exemplos de cumarinas com suas respectivas estruturas básicas	25
Tabela 4.2: Parâmetros físico-químicos teóricos do domínio Grb2-SH2	32
Tabela 4.3: Parâmetros termodinâmicos do experimento de DSC	34
Tabela 4.4: Conteúdo de estrutura secundária do domínio Grb2-SH2	36
Tabela 4.5: Valores obtidos para a constante de Stern Volmer (K_{SV})	40
Tabela 4.6: Constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) da interação	41
Tabela 4.7: Parâmetros termodinâmicos para os complexos SH2-cumarina e SH2-morina	42
Tabela 4.8: Valores da estrutura secundária do domínio Grb2-SH2 na presença das moléculas cumarina e morina.	46
Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos teóricos da proteína Grb2 ^{Y160F}	55
Tabela 5.2: Valores obtidos para a constante de Stern Volmer (K_{SV})	58
Tabela 5.3: Valores das constantes de ligação (k_b) e número de sítios de ligação (n)	59
Tabela 5.4: Valores das variações da energia livre de Gibbs ΔG , de entalpia ΔH e entropia ΔS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Dicroísmo circular
DSB	Quebra da fita dupla de DNA
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated Kinase</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR2	Receptor de fator de crescimento de fibroplasto humano 2
GM	Complexo Grb2-Mre11
Grb2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
HDR	Reparo dirigido por homologia
JNK	<i>c-Jun Amino-terminal Kinase</i>
MAPK	Via da proteína quinase ativada por mitógeno
MDC1	<i>Phosphorylated mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MRN	Complexo composto pelas proteínas Mre11, Rad50 e a Nbs1
PHE	Fenilalanina
SH2	Src Homology 2
SH3	Src Homology 3
SHP2	Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Incidência do câncer	1
1.2 O papel biológico da proteína Grb2	3
1.2.1 Regulação da via MAPK pelo equilíbrio monômero-dímero	6
1.2.2 A proteína Grb2 promove o início do reparo por homologia através da Mre11	8
2 JUSTIFICATIVA	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 Calorimetria diferencial de varredura	12
3.2 Espectropolarimetria de dicroísmo circular	13
3.3 Espectroscopia de fluorescência	15
3.4 Filtragem interna	17
3.5 Supressão de fluorescência	18
3.6 Determinação da constante de ligação e número de sítios de ligação	19
3.7 A termodinâmica da interação proteína-ligante	21
4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO GRB2-SH2 COM AS MOLÉCULAS CUMARINA E MORINA EM FUNÇÃO DO PH	22
4.1 Interação entre o dímero de Grb2 com as moléculas cumarina e morina	22
4.2 O domínio SH2	23
4.3 As moléculas cumarina e morina	25
4.4 Objetivo	28
4.5 Materiais e métodos	29
4.5.1 Expressão e purificação do domínio Grb2-SH2	29
4.5.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS	30
4.5.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	30
4.5.4 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)	30
4.5.5 Espectroscopia de fluorescência	31
4.6 Resultados e discussões	32
4.6.1 Parâmetros físico-químicos do domínio Grb2-SH2	32
4.6.2 Purificação do domínio Grb2-SH2	32
4.6.3 Caracterização do domínio Grb2-SH2 por DSC em pH 7,0 e 8,0	33

4.6.4 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)	35
4.6.5 Espectroscopia de fluorescência do domínio Grb2-SH2 e as moléculas de cumarina e morina em pH 7,0 e 8,0	36
4.6.6 Espectropolarimetria de dicroísmo circular na presença das moléculas cumarina e morina em pH 7,0 e 8,0	45
4.7 Conclusão	47
5 CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA GRB2^{Y160F} E O DNA G-QUADRUPLIX	48
5.1 Via de reparo de DNA	48
5.2 DNA G-quadruplex	50
5.3 Objetivo	52
5.4 Materiais e métodos	53
5.4.1 Expressão e purificação da proteína Grb2 ^{Y160F}	53
5.4.2 Formação da estrutura de DNA G-quadruplex	54
5.4.3 Espectroscopia de UV-visível para determinar as concentrações da proteína Grb2 ^{Y160F} e do DNA	54
5.4.4 Espectroscopia de fluorescência	55
5.5 Resultados e discussões	55
5.5.1 Parâmetros físico-químicos da proteína Grb2 ^{Y160F}	55
5.5.2 Expressão e purificação da proteína Grb2 ^{Y160F}	56
5.5.3 Avaliação da formação da estrutura do DNA G-quadruplex por dicroísmo circular	56
5.5.4 Determinação da interação entre a proteína Grb2 ^{Y160F} e o DNA G-quadruplex por espectroscopia de fluorescência	57
5.6 Conclusão	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO I	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incidência do câncer

O câncer representa um importante desafio na saúde pública global, sendo uma das principais causas de morte e um obstáculo significativo para o aumento da expectativa de vida. O aumento da incidência e da mortalidade associada a doença resulta das mudanças demográficas e epidemiológicas pelas quais estamos vivenciando [1]. Do ponto de vista demográfico, observa-se uma redução nas taxas de fertilidade e mortalidade infantil, o que tem consequentemente elevado a proporção de idosos na população. Por outro lado, a transição epidemiológica substitui as doenças infecciosas por doenças crônicas como principais causas de morte. O envelhecimento populacional, as mudanças no estilo de vida e no ambiente, incluindo fatores como mobilidade, dieta e exposição a poluentes ambientais, favorecem o aumento da incidência e da mortalidade pela doença [2,3].

No Brasil, o câncer de próstata é o tipo mais comum entre os homens, enquanto o câncer de mama é o mais prevalente entre as mulheres. Ambos estão classificados entre os 10 tipos de câncer com maior incidência na população brasileira, conforme a Figura 1.1. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio de 2023 a 2025, é esperado que ocorram cerca de 704 mil novos casos da doença [3].

Figura 1.1: Estatística dos casos de câncer no Brasil para o triênio de 2023 a 2025 de acordo com o Instituto Nacional de Câncer. Verifica-se que os cânceres com maior número de casos é o de próstata entre os homens e o de mama entre as mulheres, atingindo 30,0 % e 30,1% respectivamente.

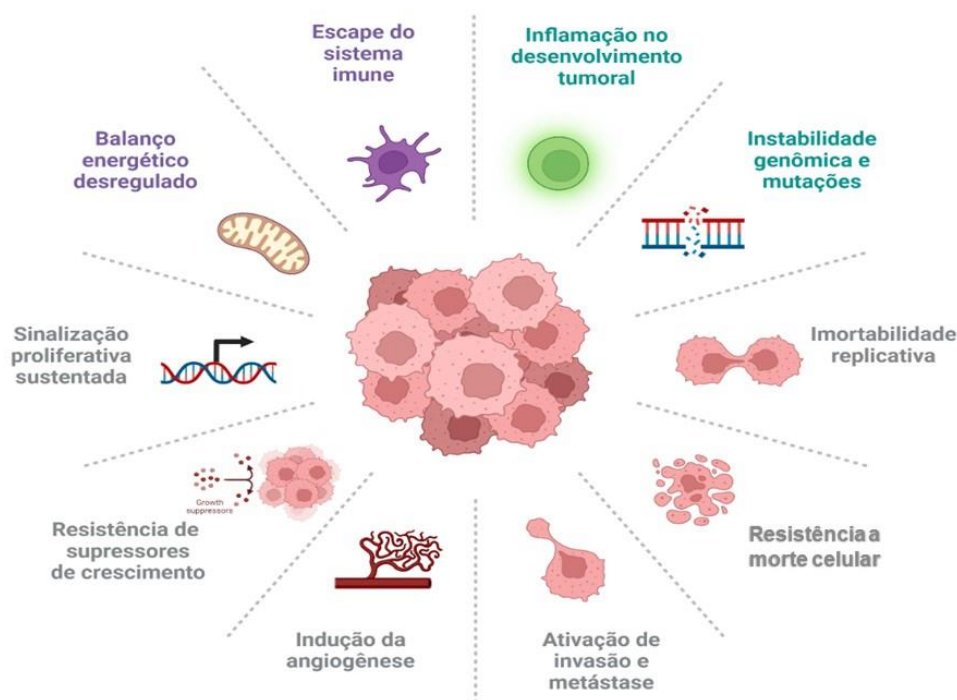
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA).

O termo “câncer” é comumente utilizado para descrever um grupo de doenças que apresentam a proliferação celular excessiva e descontrolada, que tendem a

invadir tecidos e órgãos vizinhos [4]. Nesse processo, as células tumorais podem apresentar um núcleo aumentado e irregular, nucléolos proeminentes, citoplasma escasso e intensamente corado ou excessivamente pálido, que são características indicativas do estágio da doença [5]. Além da morfologia, as células cancerígenas podem apresentar características biológicas distintas que impulsionam o seu desenvolvimento. Isso inclui sinalização proliferativa sustentada, resistência à supressores de crescimento, indução da angiogênese, instabilidade genômica e entre outros, que contribuem para a evolução e progressão do câncer [6]. A Figura 1.2 mostra o conjunto de informações que descrevem as características fundamentais de uma célula tumoral, conhecido como *hallmarks* do câncer.

Figura 1.2: Hallmarks do câncer. Principais características adquiridas por células cancerígenas.



Fonte: Adaptado de [6] - criado com Biorender.

Ainda, as células cancerígenas apresentam uma desregulação do pH. Enquanto as células saudáveis, normalmente mantêm um pH intracelular (pH_i) em torno de 7,2 e um pH extracelular (pH_e) abaixo de 7,4, as células cancerígenas demonstram variações significativas, com um pH_i superior a 7,4 e um pH_e mais baixo na faixa de 6,7 a 7,1. Esse desequilíbrio do pH não só favorece a proliferação celular e a resistência à apoptose, como também facilita a adaptação metabólica que é essencial para uma migração celular eficaz [7,8].

Essas mudanças aumentam a capacidade das células cancerígenas de sobreviver, crescer e se dividir em seus tecidos de origem e, posteriormente, de formar metástases, o que torna um grande desafio no tratamento da doença [9]. Assim, pesquisas estão sendo direcionadas para a identificação de agentes antitumorais mais específicos. Como é amplamente aceito que o câncer se desenvolve devido à desregulação da progressão do ciclo celular, a busca por novos alvos em vias de sinalização associadas à doença tem se tornado uma abordagem promissora para a concepção de novos agentes antiproliferativos [10].

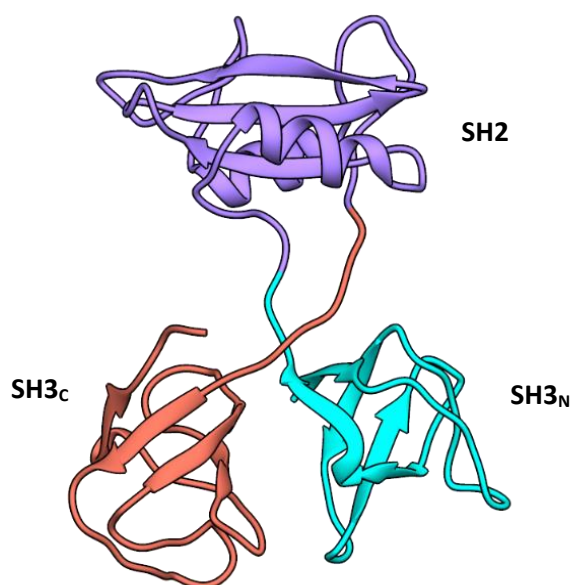
Sabe-se que proteínas contendo o domínio SH2 e/ou SH3 desempenham papéis essenciais em diversas vias de sinalização bem caracterizadas, incluindo a via da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), a qual está envolvida no crescimento, proliferação e diferenciação celular [10,11]. Este é o caso da proteína adaptadora Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*), que, embora não seja considerada uma proteína oncogênica, a formação de complexos entre Grb2/proteína parceira parece estar envolvida em muitas vias de sinalização relacionadas ao câncer [12].

Em suma, a compreensão das vias de sinalização e de proteínas, como a Grb2, no desenvolvimento do câncer oferece perspectivas promissoras tanto para a prevenção quanto para a busca por terapias para tratar as diversas condições relacionadas à doença.

1.2 O papel biológico da proteína Grb2

As proteínas adaptadoras desempenham um papel pivotal na regulação de diversas vias de sinalização, através dos seus domínios que realizam o reconhecimento de sequências específicas de aminoácidos, possibilitando a interação com proteínas parceiras [13]. A proteína Grb2 é uma adaptadora, ubiquamente expressa e conservada em organismos eucarióticos, atuando em diversas vias de sinalização de proteínas quinases [14]. Composta por 217 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular aproximada de 25 kDa, a Grb2 consiste em um domínio central SH2 flanqueado por domínios SH3 (N- e C-terminal) [15] (Figura 1.3).

Figura 1.3: Estrutura em *cartoon* da proteína adaptadora Grb2 em sua forma monomérica. O domínio SH3_C está colorido em rosa, o domínio SH2 está colorido em roxo e o domínio SH3_N está colorido em azul-ciano.

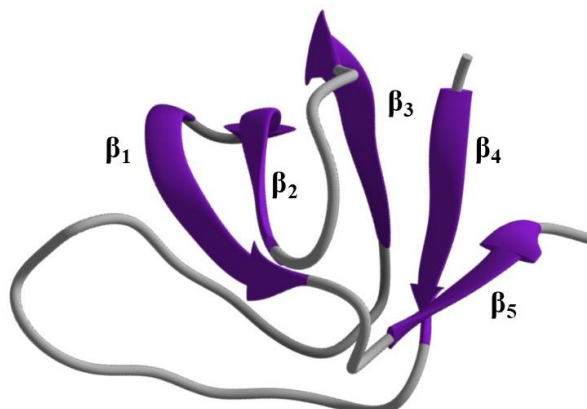


Fonte: adaptado do PDB: id 1GRI.

Os domínios SH3 estão presentes em mais de 200 proteínas diferentes e estão envolvidos em importantes processos celulares como sinalização, rearranjos, migração, modificações do citoesqueleto, além do crescimento e diferenciação celular [16]. Sendo constituído por 50 a 75 resíduos de aminoácidos, esse domínio tem afinidade por sequências ricas em prolina contendo motivo P-x-x-P, em que P são resíduos de prolina e x-x representa quaisquer outros dois resíduos de aminoácido [17]. Sua estrutura adota um enovelamento composto por folhas- β antiparalelas empacotadas uma contra a outra. A Figura 1.4 representa o domínio SH3_C da proteína Grb2, apresentando um barril- β formado por cinco folhas- β , das quais três são paralelas e duas são antiparalelas [18].

Os domínios SH2, por sua vez, estão presentes em mais de 100 proteínas diferentes, incluindo quinases, fatores de transcrição, inibidores de citocinas e proteínas adaptadores, desempenhando um papel importante na comunicação intracelular [19].

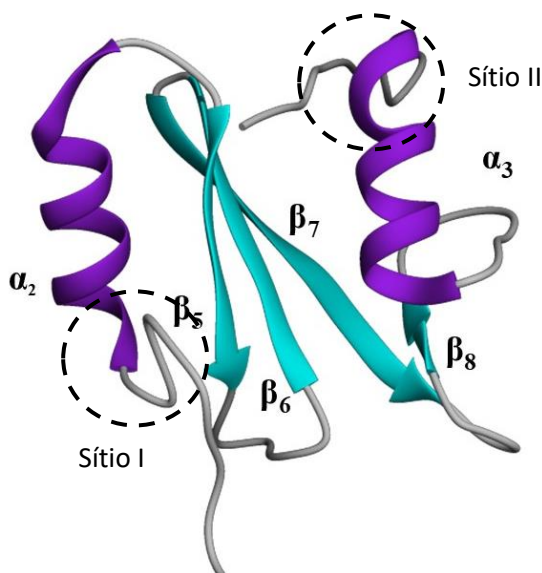
Figura 1.4: Estrutura do domínio SH3c da proteína Grb2. Esse domínio é formado por cinco folhas- β , das quais três paralelas e duas antiparalelas.



Fonte: adaptado do PDB id: 2VVK

Composto por aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, este domínio forma um módulo globular com uma estrutura secundária bem conservada. Ele apresenta uma região central em folha- β antiparalela flanqueada por duas regiões em α -hélices (Figura 1.5). Destaca-se a presença de dois sítios de interação específicos (Sítio I e Sítio II), fundamentais para mediar as interações proteína-proteína nas vias de sinalização celular [20]. Este domínio será melhor descrito na seção 4.2.

Figura 1.5: Representação tridimensional da estrutura do domínio SH2 da proteína Grb2. No qual, as regiões contendo α -hélices estão coloridas em roxo, folha- β colorida em azul e os loops em cinza. Os círculos pretos evidenciam os dois sítios de ligação.



Fonte: adaptado do PDB id: 6VK2.

Estudos recentes têm revelado que a proteína Grb2 desempenha funções que vão além de uma proteína adaptadora. Assim, um novo papel foi estabelecido para a Grb2, com implicações significativas na patogênese do câncer, por meio da regulação

da biogênese de miRNA e da expressão do oncogene [21]. Além disso, a Grb2 está envolvida no reparo da quebra da fita dupla de DNA (DSB), por meio do direcionamento e liberação da proteína Mre11 para promover um reparo eficiente da DSB, assegurando assim a estabilidade do genoma [22]. A Grb2 também regula a cascata de sinalização mediada pela FGFR2 através da formação do heterotetrâmero FGFR2:Grb2 um dímero, antes da estimulação celular [23]. De acordo com Ahmed e colaboradores [24], foi demonstrado que o equilíbrio monômero-dímero de Grb2 é um importante mecanismo de regulação da via da MAPK, em que o monômero de Grb2 ativa essa via de sinalização. Em contrapartida, a Grb2 em sua forma dimérica atua como um inibidor do processo de sinalização mediado por MAPK. Isso evidencia a importância da proteína Grb2 nos processos celulares, que justifique a necessidade de estudos detalhados sobre seus mecanismos moleculares de interação.

1.2.1 Regulação da via MAPK pelo equilíbrio monômero-dímero

Geralmente, as proteínas receptoras de membrana são encontradas em um estado inativo, como monomérico ou pré-dimérico. Sua ativação pode ocorrer por meio da interação com moléculas estimuladoras, levando à estabilização das proteínas de membrana, permitindo assim a ativação [25].

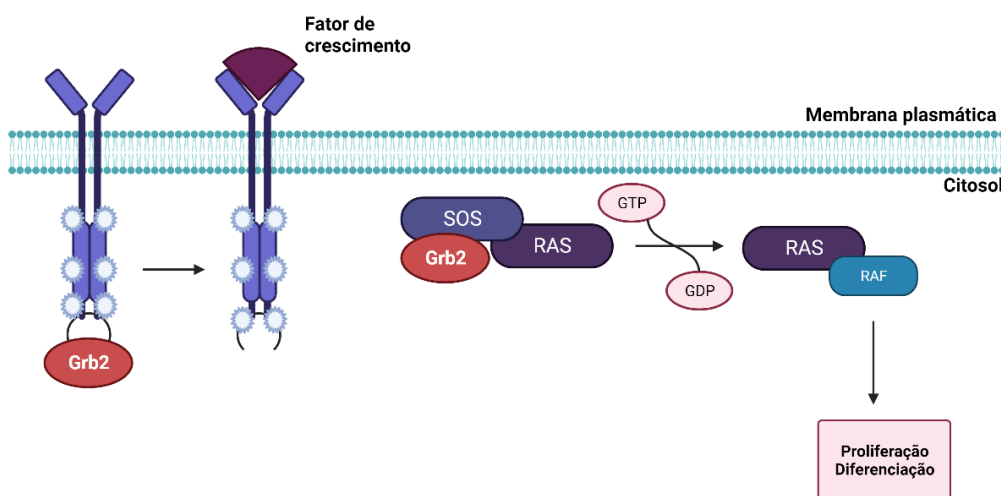
A Grb2 é conhecida por sua interação com o receptor de fator de crescimento de fibroblasto humano (FGFR). Foi observado que essa interação entre a proteína Grb2 e a proteína FGFR2 pode ocorrer mesmo na ausência de estímulos extracelulares [23]. Nessa circunstância, a FGFR2 autofosforila-se antes de qualquer estímulo extracelular, resultando em um estado de fosforilação basal. Esse estado, embora fosforilado, não é suficiente para ativar a via de sinalização.

A Grb2 é encontrada em suas formas monomérica e dimérica na via de sinalização. A forma monomérica ativa a via de sinalização, enquanto a forma dimérica a desativa. Entretanto, no nível de fosforilação basal, a Grb2 dimérica é capaz de interagir via domínio SH3C na região C-terminal do FGFR2, formando o complexo FGFR2-Grb2. Quando os fatores de crescimento se ligam à região extracelular do receptor tirosina quinase, a Grb2 é fosforilada e se dissocia da FGFR2, deixando-a livre para interagir com proteínas parceiras no citosol e ativar vias de sinalização a jusante, como a via de sinalização MAPK [23,24].

Para compreender o papel da Grb2 na ativação indireta da via de sinalização da MAPK, a Figura 1.6 apresenta um esquema com as sequências de eventos que levam à iniciação da MAPK. A FGFR2 em seu estado dimérico na membrana celular, induz a proximidade dos domínios quinase na região intracelular, permitindo sua autofosforilação. Essa fosforilação aumenta a atividade intrínseca da quinase da FGFR2 e fornece eventos secundários de fosforilação da tirosina na região da justamembrana, no domínio da quinase e na extremidade C-terminal da FGFR2. As tirosinas fosforiladas, bem como sequências adjacentes específicas, fornecem sítios de ancoragem para proteínas contendo domínios SH2 e SH3.

O domínio C-SH3 da proteína Grb2 reconhece o motivo PxxP na região C-terminal da proteína FGFR2, possibilitando a interação Grb2-FGFR2 [23,26]. Quando um fator de crescimento interage na porção extracelular da FGFR2, a proteína Grb2 se dissocia e, por meio de seu domínio SH2, recruta proteínas parceiras como a *Sono of Sevenless* (Sos), a qual é responsável por promover a troca de GDP em GTP. A Grb2 então se associa à proteína Sos, reposicionando-se na membrana onde encontra a proteína Ras-GDP. Esta é ativada pela Sos convertendo-se em Ras-GTP, que posteriormente recruta a proteína Raf, permitindo a fosforilação desta última, tornando-a capaz de ativar a via de sinalização MAPK [23,26,27].

Figura 1.6: Representação da ativação da via de sinalização MAPK. Após a interação do fator de crescimento na região extracelular, ocorre a fosforilação da Grb2 induzida pela FGFR2. A Grb2, então, se dissocia da FGFR2 e recruta a SOS via domínio SH3. A SOS promove a troca de RAS-GDP por RAS-GTP. Desta forma, a proteína RAS é ativada e interage com a proteína RAF, dando início a via da MAPK.



Fonte: Adaptado de [27] - criado com Biorender.

Ao mesmo tempo, a Grb2 desempenha um papel regulador na via de sinalização mediada pela FGFR2 em conjunto com a proteína fosfatase Shp2, por meio de um ciclo regulatório que envolve fosforilação e desfosforilação entre as proteínas Shp2, Grb2 e FGFR2, fundamental na regulação da atividade quinase da proteína FGFR2 [28]. A ativação do receptor FGFR2 por fatores de crescimento permite a recrutação de outras proteínas para iniciar cascatas de sinalização. No entanto, sem a regulação adequada, essas cascatas de sinalização podem causar danos ao organismo. Na via de sinalização MAPK, a falta de regulação leva a um crescimento celular descontrolado, o que pode resultar no desenvolvimento de certos tipos de câncer [28,29].

1.2.2 A proteína Grb2 promove o início do reparo por homologia através da Mre11

Danos ao DNA são eventos comuns durante o ciclo celular, sendo capazes de ocasionar mutações. Tais danos desencadeiam diversas respostas celulares, visando corrigir os erros ou até mesmo ativar a morte celular programada para eliminar possíveis mutações. As quebras na fita dupla de DNA (DSBs) são mais citotóxicas e possuem um grande potencial para comprometer a estabilidade genômica [30].

Os DSBs são inicialmente detectados pelo complexo enzimático MRN, que recruta proteínas quinases responsáveis pela sinalização e ativação do mecanismo de Checkpoint, interrompendo o ciclo celular para corrigir o dano e prevenir a transmissão dos erros às células em divisão. Os mecanismos de correção de DSBs dividem-se em dois tipos: Recombinação Homóloga (HR) e Recombinação não-Homóloga (NHEJ) [30].

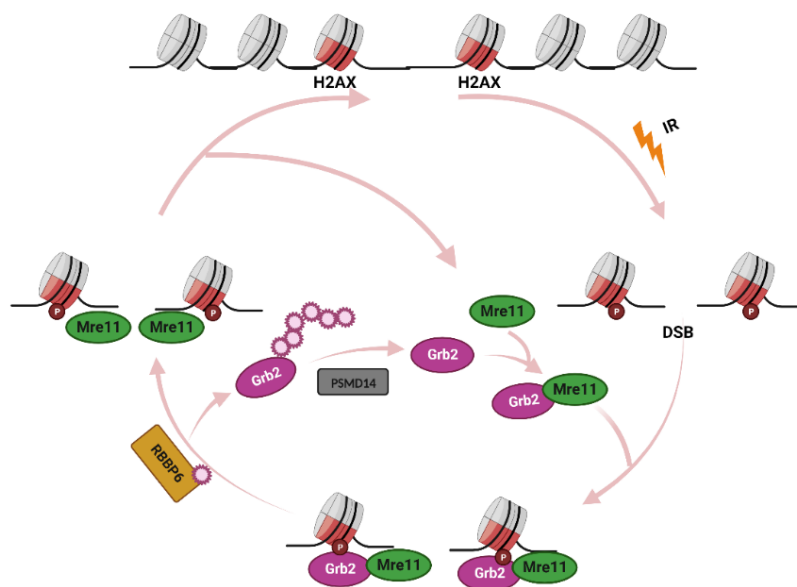
Estudos revelam que a Grb2 forma inesperadamente um complexo Grb2-Mre11 (GM), validado biofisicamente para uma iniciação eficiente da HR [22]. A Mre11, componente do complexo MRE junto com Rad 50 e Nbs1, desempenha um papel importante na via de reparo de DNA, evitando o acúmulo de quebras e rearranjos cromossômicos prejudiciais [31]. O recrutamento do complexo MRN para DSBs é rápido e independe de modificações pós-traducionais nas proteínas do complexo. Em resposta ao dano, a histona variante H2AX é inicialmente fosforilada em seu resíduo tirosina-142 (pY142) [32], seguida pela fosforilação da serina-139 (pS139), formando

a γ H2AX, uma plataforma para o recrutamento de proteínas na via de reparo de DNA [33].

A γ H2AX é crucial para recrutar o complexo MRN para a cromatina, por meio da associação de NBS1-MDC1-H2A. Nesse processo, a proteína NBS1 interage com a proteína MDC1 (*Phosphorylated Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1*) que, por sua vez, se liga à γ H2AX, estabelecendo um mecanismo de recrutamento do complexo MRN para locais de danos no DNA [34-37]. O recrutamento da Grb2 na cromátide ocorre imediatamente após o dano ao DNA. Assim, a proteína Grb2 recruta eficientemente a Mre11 para os locais de danos ao DNA marcados por γ H2AX.

A ubiquitinação da Grb2 pela proteína RBBP6 desencadeia a liderança da Mre11, promovendo a reparação dirigida por homologia. A desubiquitinação permite a formação do complexo GM novamente, através da proteína PSMS14, conforme ilustrado na Figura 1.7. A ausência da proteína Grb2 resulta em defeitos no processo de HR, intensificando a atividade de reparação por NHEJ, um método de reparo de DSBs mais suscetível a erros. Portanto, fica evidente que a proteína Grb2 desempenha um papel vital na facilitação de um processo altamente preciso e eficiente de reparo dirigido por homologia [22].

Figura 1.7: Esquema proposto para descrever o papel da Grb2 no reparo da DSB. IR cria DSBs e fosforilação da H2AX, que serve como local de ancoragem para o recrutamento do complexo GM. A ubiquitinação da Grb2 por RBBP6 libera a Grb2 do Mre11, enquanto a desubiquitinação de Grb2 possivelmente por PSMS14 permite a reassociação do complexo GM.



Fonte: Adaptado de [22] - criado com Biorender.

Como será discutido, diversos fatores contribuem para que ocorram danos ao DNA, dentre elas a formação de estruturas secundárias de DNA [38]. Essas estruturas secundárias, como o G-quadruplex, são reconhecidas pelo seu potencial em induzir instabilidade genômica. Dependendo da sua localização, a formação dessas estruturas G-quadruplex pode interferir na transcrição gênica, causar bloqueios na forquilha de replicação ou induzir mutações [39]. Durante o reparo por recombinação homóloga, a formação do G-quadruplex pode resultar em paradas na forquilha de replicação. Por isso, estudos envolvendo proteínas provenientes da HR, como o caso da Grb2, interagindo com estruturas G-quadruplex, seriam de interesse, visando maior eficiência nos processos de reparo e na manutenção da estabilidade genômica [40].

2 JUSTIFICATIVA

A proteína adaptadora Grb2 está presente em vias de sinalização responsáveis por processos como proliferação e diferenciação celular. Sua principal função é atuar como ponte entre receptores de membrana, que reconhecem fatores de crescimento, e outras proteínas, desencadeando reações químicas que resultam na síntese de transcrição no núcleo celular. Além disso, a Grb2 está presente na regulação de proteínas por meio do equilíbrio monômero-dímero e participa dos processos de reparo de DNA, essenciais para o funcionamento adequado das células. No entanto, anomalias associadas à atividade da Grb2 podem levar ao desenvolvimento de certas doenças, como o câncer.

Considerando a ampla participação da Grb2 nos processos biológicos de uma célula, ela se torna um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias anticarcinogênicas, por meio de pesquisas com moléculas farmacológicas e até mesmo com estruturas secundárias de DNA. Assim, uma parcela deste estudo tem como objetivo caracterizar o domínio Grb2-SH2 e sua interação com moléculas que possuem potencial antitumoral por meio de técnicas experimentais como espectroscopia de fluorescência, calorimetria e dicroísmo circular. Todos os experimentos serão realizados em pH 7,0 e 8,0 para mimetizar células saudáveis e cancerígenas, respectivamente.

Além disso, investigaremos a interação da proteína recombinante Grb2 mutante Y160F, que favorece o estado monomérico, com um tipo de estrutura secundária de DNA, conhecido como DNA G-quadruplex. Essa análise visa compreender a interação da proteína com a estrutura G-quadruplex, uma vez que esse tipo de DNA, contribui para a instabilidade do genoma.

Com o desenvolvimento deste estudo, espera-se preencher lacunas no entendimento das funções da proteína Grb2 e seu potencial impacto na regulação e na patogênese de doenças, contribuindo assim para novas abordagens terapêuticas e tratamentos mais eficazes.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Calorimetria diferencial de varredura

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica experimental que se baseia em uma análise térmica, no qual o fluxo de calor contribui significativamente para identificação da estabilidade das macromoléculas. A capacidade de monitorar transições em proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, não só fornece dados sobre a estabilidade térmica, como também é possível examinar e analisar as características dos estados intermediários que envolvem o enovelamento/desenovelamento das biomoléculas [41]. Identificar as transições é de grande importância pois permite analisar a quantidade de energia presente em cada uma dessas transições. Trata-se de um método analítico amplamente aplicado no processo de desnaturação proteica [42]. O calorímetro utiliza alta sensibilidade para detectar pequenas variações de energia, associadas, por exemplo, ao processo de desdobramento [43].

Os dados obtidos pelo calorímetro são apresentados na forma de capacidade térmica versus temperatura e convertidos no chamado termograma (capacidade de calor a pressão constante C_p versus temperatura) [41]. O pico aparente do termograma indica a principal temperatura de transição, ou temperatura de *melting* (T_m) e a área sob a curva do termograma determina a variação de entalpia (ΔH) do processo em estudo, indicando o parâmetro termodinâmico, no qual a energia disponível fornece calor ao sistema. Essa energia pode fazer ou quebrar ligações na proteína, como pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto, ligações iônicas, entre outras [41,42].

Quando $\Delta H < 0$, o calor é liberado do sistema, denomina-se reação exotérmica. Enquanto $\Delta H > 0$, o calor é absorvido pelo sistema, conhecido como reação endotérmica. A definição da entalpia com a energia interna e o produto da pressão e do volume, é dada como [44]:

$$H = U + PV \quad (1)$$

no qual, U a energia interna do sistema, P a pressão e V o volume.

Tomando a diferencial da equação (1), temos que:

$$dH = dU + VdP + PdV \quad (2)$$

Partindo da primeira lei da termodinâmica, temos que $dU + PdV$ é, $\overline{dQ}$:

$$dH = \overline{dQ} + VdP \quad (3)$$

Quando a pressão é constante ($P = \text{constante}$), a equação (3) fica:

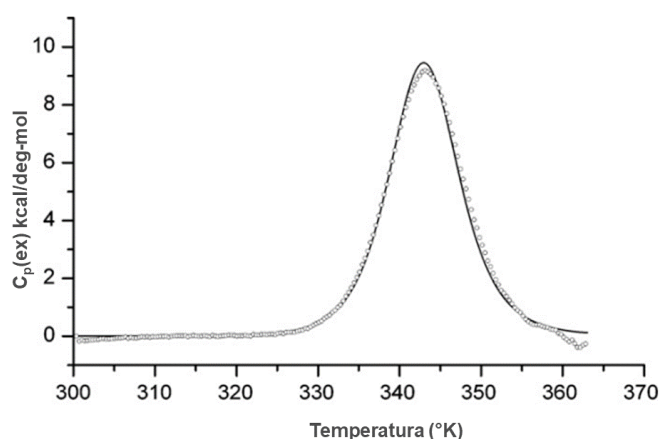
$$dH = \overline{dQ_p} \quad (4)$$

Então temos que,

$$\Delta H = Q_p \quad (5)$$

A variação de entalpia (ΔH) é, portanto, um indicador da quantidade de energia na forma de calor presente no processo estudado, que é responsável por mudanças de fase ou estruturais em macromoléculas. Um exemplo de termograma de DSC está representado na Figura 3.1 [41-44].

Figura 3.1: Representação de um termograma de DSC. Dados de um grampo de DNA, a curva experimental está em círculo enquanto a curva sólida representa a derivada da entalpia.



Fonte: Adaptado de [41].

3.2 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

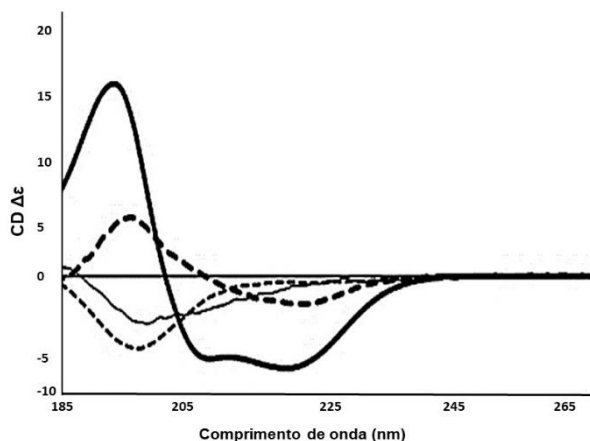
As biomoléculas, como as proteínas, são constituídas por subunidades quirais que produzem sinais quando iluminadas por luz circularmente polarizada nas faixas de comprimento de onda ultravioleta, onde os grupos amida e carbonila dos esqueletos polipeptídicos absorvem essa luz. A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um método espectroscópico óptico que explora a absorção diferencial de luz polarizada circularmente à esquerda ($\mathcal{E}_R$) e à direita ($\mathcal{E}_L$) por tais cromóforos e pode ser aproveitada para derivar informações estruturais sobre conformações de proteínas

[45]. Instrumentos de CD são conhecidos como espectropolarímetro e relatam a diferença em absorção de luz polarizada esquerda e direita ($\Delta A = A_{\text{EL}} - A_{\text{ER}}$); entretanto, essa diferença é expressa como elipticidade molar (θ medido em graus). Os espectros de CD são coletados como uma função comprimentos de onda. A luz polarizada passa pelo meio circularmente dicróico, onde a absorção diferencial dos dois componentes circulares converte a luz plano polarizado em luz elipticamente polarizada, o vetor elétrico segue a localização da elipse, no qual oscilam em um plano ou formam um círculo [46]. Quando as duas componentes circulares dos vetores elétricos estão na mesma direção, a soma das suas magnitudes forma o semieixo maior da elipse, e quando em direção oposta, a diferença das magnitudes forma o semieixo menor. O sinal CD é caracterizado pela razão entre o eixo menor e maior da elipse, que é tangente o ângulo θ , chamado de elipticidade expressa pela relação:

$$[\theta] = \tan^{-1} \left(\frac{\text{eixo maior}}{\text{eixo menor}} \right) \quad (6)$$

Esta técnica tem sido amplamente utilizada para elucidar a estrutura secundária de proteínas em seu estado nativo ou enoveladas. Também, se baseia em duas transições eletrônicas decorrentes de absorção de peptídeos no UV: uma transição $n \rightarrow \pi^*$ que produz um sinal em torno de 222 nm; e transições paralelas e perpendiculares $\pi \rightarrow \pi^*$ que geram sinais em comprimentos de onda mais baixos na faixa de 190–210 nm. Além disso, uma transição de transferência de carga intra-amida decorrentes de interações através do espaço ocorre em cerca de 180 nm, que geralmente só é acessível usando radiação síncroton como fonte de luz [47]. A adoção de diferentes tipos de estruturas secundárias pelas cadeias polipeptídicas, como α -hélice e fita- β , depende dos ângulos Φ e Ψ e o entre resíduos adjacentes na cadeia. As magnitudes e comprimentos de onda dos sinais de CD que surgem das transições eletrônicas dependem desses ângulos e, portanto, da estrutura secundária da proteína. A forma geral e a magnitude de um espectro de proteína, obtido por Dicroísmo Circular (CD) na região de comprimento de onda do ultravioleta distante (UV) reflete uma combinação linear de seus elementos estruturais secundários constituintes. A Figura 3.2 ilustra alguns exemplos de espectros de proteínas que demonstram essa característica [47,48].

Figura 3.2: Exemplos de vários espectros de CD de proteínas com diferentes tipos de estrutura secundária. (—) predominantemente helicoidal, (- - -) fita- β antiparalela, (—) fita- β torcida para a direita, (...) desordenado. Os dados espectrais utilizados nestas figuras estão disponíveis no PCDDDB com os códigos de acesso: CD0000037000, CD0000020000, CD0000031000 e CD0005282000, respectivamente.



Fonte: Adaptado de [48]

3.3 Espectroscopia de fluorescência

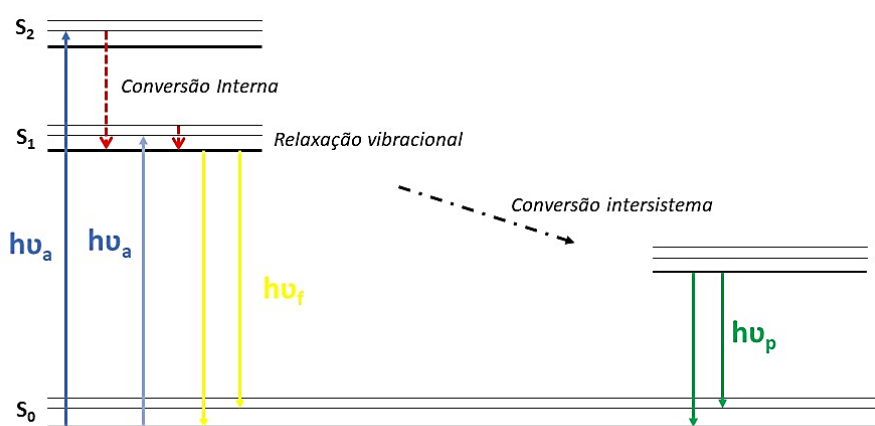
A luminescência é o processo pelo qual substâncias em estados excitados emitem luz. Essa emissão de luz pode ser classificada em dois tipos, dependendo da natureza do estado excitado do elétron: fosforescência e fluorescência [49].

Quando uma molécula absorve radiação eletromagnética na forma de fóton, um elétron é promovido de seu estado energético fundamental S_0 para estados excitados, como S_1 e S_2 , e posteriormente retorna ao estado de menor energia através de vários mecanismos, como conversão interna, relaxação vibracional, conversão intersistema, fluorescência e fosforescência, que resultam na emissão de luz. O diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 3.3) descreve os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão de luz. Depois que uma molécula absorve luz, o fluoróforo pode atingir níveis vibracionais mais altos dos estados singletos S_1 e S_2 , e vários processos ocorrem até que ele retorne ao estado fundamental [49-51].

Quando um fluoróforo é excitado para seu estado eletrônico singlete de maior energia (S_1 ou S_2), os elétrons podem ocupar diferentes níveis de energia vibracional. Essas transições entre os estados geralmente são representadas como linhas verticais ilustrando a natureza instantânea da absorção da radiação e ocorrem na ordem de 10^{-15} s. A transição entre os estados eletrônicos singlete (S_1 e S_2) é

conhecida como conversão interna. Esse processo é seguido por relaxação vibracional até o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico de menor energia, com tempo característico da ordem de 10^{-12} s [49-51].

Figura 3.3: Diagrama de Jablonski. Visualização das transições eletrônicas acessíveis S_1 e S_2 , que ocorrem após a absorção de um fóton, juntamente com os processos de emissão de fluorescência no retorno ao estado fundamental S_0 . A absorção de radiação ($h\nu_a$), representada pelas setas apontadas para cima, leva os átomos ou as moléculas para estados eletrônicos mais energéticos (S_1 e S_2). No entanto, eles não permanecem em seus estados mais energéticos, uma vez que a energia absorvida é degradada ou perdida, resultando em seu retorno aos estados fundamentais (S_0). As setas dirigidas para baixo indicam a emissão de radiação para fluorescência ($h\nu_f$) e fosforescência ($h\nu_p$), respectivamente. Além disso, as setas pontilhadas representam as conversões internas, que são os processos de relaxação entre os níveis eletrônicos excitados.



Fonte: Adaptado de [49]

Uma vez que o tempo de vida de um elétron no estado excitado é da ordem de 10^{-8} s, a energia absorvida que não foi dissipada durante esse processo é então liberada, permitindo que o fluoróforo retorne ao seu estado fundamental. Esse fenômeno é chamado de fluorescência, e a radiação emitida possui menor energia do que a radiação de excitação, o que resulta em um comprimento de onda maior, devido à relação inversamente proporcional entre energia e frequência, expressa como:

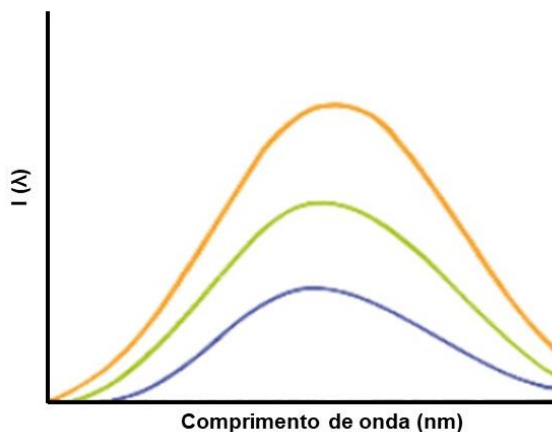
$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (7)$$

No qual ν a frequência, c a velocidade da luz e λ comprimento de onda [49].

As medições de fluorescência no estado estacionários, são as mais comuns e são aquelas realizadas com iluminação e observação constantes. A amostra é iluminada com um feixe contínuo de luz, e a intensidade ou espectro de emissão é registrado (Figura 3.4). Devido à escala de tempo na ordem de nanossegundos, a maioria das medições são feitas em estado estacionário. Quando a amostra é

inicialmente exposta à luz, o estado estacionário é alcançado quase que instantaneamente [49].

Figura 3.4: Espectro de fluorescência no estado estacionário.



Fonte: Adaptado de [49]

A técnica de fluorescência é de suma importância na análise de proteínas, uma vez que auxilia na caracterização físico-química, na análise de propriedades estruturais e nas dinâmicas de biomoléculas e complexos biomoleculares. Estudos de fluorescência com variação de temperatura fornecem informações sobre estabilidade e parâmetros cinéticos [50].

Em proteínas, os fluoróforos são os resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Entre eles, o resíduo de triptofano é a principal fonte de absorção e emissão de luz UV, destacando-se pela alta sensibilidade. Embora a tirosina apresente um rendimento quântico semelhante ao triptofano, sua emissão em proteínas nativas a emissão é frequentemente inibida devido à interação com a cadeia peptídica. No entanto, essa inibição é superada durante a desnaturação da proteína, resultando em um aumento na emissão desse resíduo. Por outro lado, a emissão de fenilalanina é observada apenas em proteínas que não possuem resíduos de tirosina ou triptofano [49].

3.4 Filtragem interna

A intensidade de fluorescência observada em uma amostra depende não somente da absorção na faixa de comprimento de onda de excitação, mas também pela geometria de iluminação da amostra e pelos caminhos ópticos percorridos pela

luz de excitação e emissão. A geometria frequentemente empregada consiste na incidência de luz em uma face da cubeta sob um ângulo reto, geometria também empregada neste trabalho [52].

Em um espectrofluorímetro convencional, o feixe de emissão é detectado perpendicularmente ao feixe de excitação. Como a emissão é registrada no centro da cubeta, o feixe incidente atravessa metade do comprimento do caminho óptico antes que a emissão seja gerada, e o feixe de emissão deve também passar pela metade do comprimento do caminho óptico antes de ser detectado [53]. Devido a esse sistema, a intensidade da emissão observada (F_{obs}) é subestimada, e é necessário fazer uma correção para levar em conta o efeito do filtro interno causado pela absorção da luz pela solução. Portanto, a correção da intensidade de fluorescência deve ser feita para compensar o efeito do filtro [54,55].

A correção da intensidade de fluorescência, devido ao efeito de filtragem interna, é realizada utilizando a equação 8:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(A_{ex}+A_{em})/2} \quad (8)$$

sendo, F_{corr} e F_{obs} as intensidades de fluorescência corrigida e observada, respectivamente. A_{ex} e A_{em} são as absorbâncias do ligante no comprimento de onda de excitação e no comprimento de onda de emissão, respectivamente [55].

3.5 Supressão de fluorescência

Alterações no ambiente químico que envolve o sítio de ligação de proteínas podem resultar em alterações na fluorescência dos resíduos aromáticos, quando estes estão presentes em regiões próximas ao sítio de ligação. A diminuição ou supressão (conhecida como *quenching*) de fluorescência desses resíduos podem ser utilizados em ensaios de interação proteína-ligante, empregada para determinar a constante de afinidade [49].

A supressão da fluorescência em uma solução que contém uma macromolécula e seu ligante pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos. O *quenching* colisional, ocorre a partir da colisão entre partículas, sem ocorrência de interação. Outra possibilidade é o fluoróforo no seu estado excitado, dissipar energia de forma não radiativa, através de ligação ou transferência de energia, conhecido como *quenching*

dinâmico. Mudanças estruturais induzidas pela ligação entre a macromoléculas e seu ligante também podem desencadear alterações no ambiente químico em torno do fluoróforo. Essa ligação pode resultar na formação de um complexo entre o ligante e o fluoróforo no seu estado fundamental, perdendo a sua capacidade de fluorescência (*quenching* estático) [56].

A supressão da fluorescência, ou *quenching*, de uma amostra pode ser causado devido a interações moleculares. Para determinar tais parâmetros, o mecanismo de supressão de fluorescência de Stern-Volmer, também conhecido como modelo de supressão dinâmica da fluorescência, tem sido utilizado. No mecanismo, a supressão da fluorescência depende da colisão entre a molécula excitada e a espécie supressora (Q) com constante de velocidade de supressão bimolecular K_q . A redução da intensidade de emissão de fluorescência (F), em relação à intensidade observada na ausência de supressor (F_0), [49-51] é dada pela equação:

$$(F_0/F) = 1 + K_q t_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (9)$$

no qual, F_0 e F são as intensidades de fluorescência corrigidas na ausência e na presença de supressor, respectivamente. K_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão, t_0 é o tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor, e o produto $K_q t_0$ é conhecido como constante de Stern-Volmer (K_{SV}) [49].

3.6 Determinação da constante de ligação e número de sítios de ligação

Para determinar a constante de ligação (K_b), assume-se um sistema de dois estados, no qual:



No qual, P é a proteína livre, n é o número de sítios de ligação, L o ligante e L_nP como o complexo proteína-ligante formado. Sendo assim, a constante de ligação (K_b) pode ser expressa da seguinte maneira:

$$k_b = \frac{[L_nP]}{[P][L]^n} \quad (11)$$

definindo, $[P]$ como a concentração de proteína, $[L]$ a concentração de ligante e $[L_nP]$ a concentração do novo complexo formado e n o número de ligantes por proteína. No caso em que a proteína pode se encontrar complexada ou livre do ligante, temos:

$$[P_t] = [L_nP] + [P_f] \quad (12)$$

No qual $[P_f]$ é a concentração de proteína livre e $[P_t]$ a concentração de proteína total. A razão entre a intensidade de fluorescência da solução que dispõe de proteína livre F_0 e a intensidade de fluorescência após a adição de ligante na solução F é igual a razão entre a concentração de proteína total por proteína livre:

$$\frac{[P_t]}{[P_f]} = \frac{F_0}{F} \quad (13)$$

Em relação a proteína ligada $[P_a]$:

$$[P_a] = [L_nP] \quad (14)$$

Tem-se:

$$[P_t] = [P_a] + [P_f] \quad (15)$$

Substituindo as equações (14) e (15) em (11), temos:

$$k_b = \frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f][L_f]^n} \quad (16)$$

Prosseguindo,

$$k_b = \frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f][L_f]^n} \quad (17)$$

Assim,

$$\frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f]} = \frac{F_0 - F}{F} \quad (18)$$

Logo,

$$\frac{F_0 - F}{F} = k_b [L_f]^n \quad (19)$$

Admite-se, então, que a concentração de ligante na solução é maior que a concentração de proteína, sendo a concentração de ligante total aproximadamente igual a concentração de ligante livre $[L_t] \cong [L_f]$. Logo, a equação de supressão para o equilíbrio de ligação, torna-se:

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log (K_b) + n \log ([L]) \quad (20)$$

sendo F_0 e F as intensidades de fluorescência antes e após a adição de ligante, K_b a constante de ligação, n o número de ligantes por proteína e $[L]$ a concentração de ligante total [49-51].

3.7 A termodinâmica da interação proteína-ligante

O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação. Essas interações podem ser tanto contribuições entálpica (ΔH) quanto entrópica (ΔS) e, como qualquer processo espontâneo, a ligação ocorre quando está associada à energia livre de Gibbs negativa ($\Delta G < 0$) a qual é dada por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (21)$$

ou em função da constante de ligação K_b , onde:

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad (22)$$

sendo R a constante universal dos gases, T a temperatura e K_b é a constante de ligação.

As variações entálpicas (ΔH) e as entrópicas (ΔS) podem ser analisadas pela equação de van't Hoff, quando ΔH não variar de forma significativa no intervalo de temperatura estudado [49]:

$$-R \ln(K_b) = \Delta H/T - \Delta S \quad (23)$$

A contribuição entálpica envolve a quebra ou formação de interações não covalentes entre átomos de proteínas e entre solvente e proteína, enquanto a contribuição entropia, devido a mudanças dinâmicas na organização da cadeia principal e lateral de proteínas e solventes, interage especialmente com superfícies hidrofóbicas. A contribuição entrópica é dominante em muitas interações proteína-ligante onde as moléculas de água são liberadas de cavidades hidrofóbicas [50,51].

4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O DOMÍNIO GRB2-SH2 COM AS MOLÉCULAS CUMARINA E MORINA EM FUNÇÃO DO PH

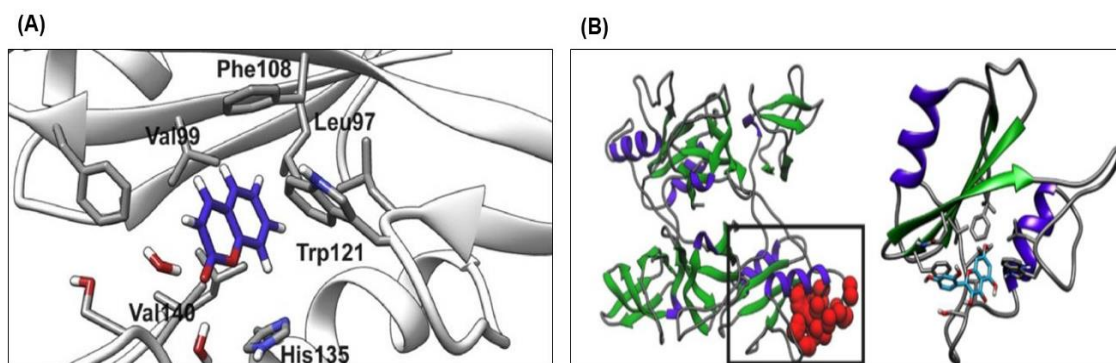
4.1. Interação entre o dímero de Grb2 com as moléculas cumarina e morina

Como discutido, o câncer é um processo patológico caracterizado pela proliferação celular descontrolada, em que as células adquirem diversos mecanismos que favorecem sua sobrevivência e multiplicação [4]. A via de sinalização da MAPK é responsável pelos processos de proliferação e diferenciação celular. A ausência de regulação nessa via pode resultar em um crescimento celular descontrolado, levando ao desenvolvimento de certos tipos de câncer [24]. Com isso, estudos com moléculas de potencial farmacológico têm sido usados para investigar uma possível interação com proteínas envolvidas nessa via de sinalização, como o caso da proteína Grb2 [57].

Assim, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram que a Grb2, em sua forma dimérica, interage de maneira satisfatória com as moléculas cumarina e morina. Essas moléculas possuem ampla biodisponibilidade e são extensivamente estudadas devido à baixa toxicidade e seus efeitos antitumorais. As análises são fundamentadas na aplicação de técnicas de biofísica molecular para verificar a interação proteína-ligante. Esse processo ocorre principalmente por contribuições entrópicas, com uma razão molecular de um ligante por proteína e uma constante de equilíbrio da ordem de 10^5 M^{-1} , considerada moderada. Além disso, os resultados obtidos por dinâmica computacional indicam que a interação entre essas moléculas e o dímero de Grb2 ocorre em um bolsão hidrofóbico do domínio SH2, próximo ao resíduo W121 (Figura 4.1) [58,59].

Embora o significado biológico preciso da interação entre o domínio Grb2-SH2 e as moléculas citadas ainda não estejam completamente elucidados, torna-se evidente que essa interação poderia funcionar de maneira análoga a um inibidor do domínio SH2. Isso impediria a ligação da quinase de tirosina do receptor à via MAPK, quando esta apresentar alguma disfunção [60-63].

Figura 4.1: Identificação do sítio de interação do dímero de Grb2 com as moléculas cumarina e morina. (A) Ligação da molécula de cumarina próximo ao resíduo de triptofano 121. (B) Ligação da molécula de morina ao domínio Grb2-SH2.



Fonte: Adaptado de [58,59].

4.2 O domínio SH2

O domínio SH2 foi identificado pela primeira vez nas oncoproteínas Src e Fps, com uma sequência de 100 resíduos de aminoácidos [64,65]. Desde a sua descoberta, foram identificados mais de 120 domínios SH2 em mais de 110 proteínas, sendo estas quinases, fatores de transcrição, fosfatases, proteínas adaptadoras e supressores de citocinas [64-66]. Esses domínios se associam especificamente a proteínas que possuem tirosinas fosforiladas (pY) em suas cadeias laterais, desempenhando um papel crucial na formação de complexos multiproteicos durante a sinalização celular. São comumente encontrados em proteínas adaptadoras, auxiliando na transdução de sinal das vias receptoras tirosina quinase [67-69].

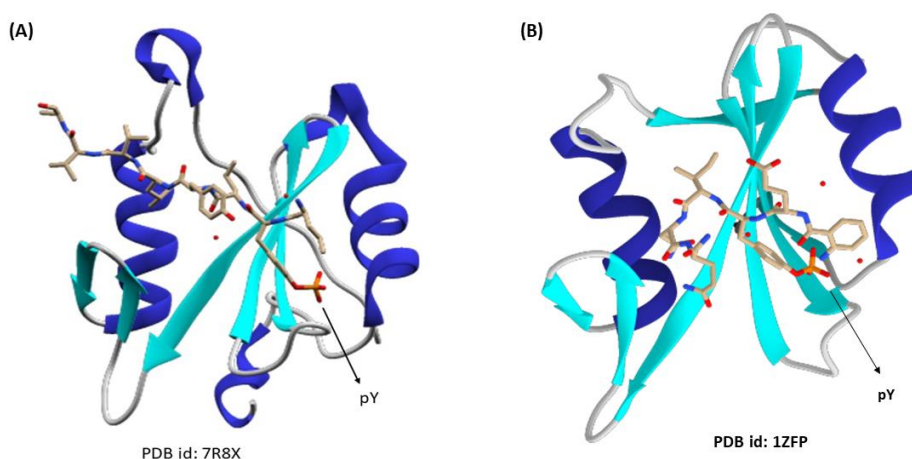
Como mencionado, o domínio Grb2-SH2 possui uma estrutura altamente conservada composta de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, contendo duas α -hélices e uma folha- β formada por três fitas antiparalelas. Além disso, esse domínio proteico apresenta dois sítios de interação bem definidos para o reconhecimento de fosfopeptídeos [10,61].

O sítio I de interação desempenha um papel fundamental no reconhecimento de fosfopeptídeos contendo resíduos de tirosina fosforilados (pY). Esse sítio é constituído por resíduos com cargas positivas e com cadeias laterais estruturalmente próximas, facilitando a formação de interações por meio de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. Por outro lado, o sítio II está localizado nas proximidades da

α 3-hélice. reconhecendo pY localizados em posições pY+1 até pY+5 de resíduos de aminoácidos [10,70].

Estudos indicam que o sítio II determina a especificidade da interação. O fosfopeptídeo se liga ao domínio SH2 com uma conformação linear na superfície do domínio estendendo-se de uma α -hélice à outra (Figura 4.2 – A). Uma exceção a essa conformação linear ocorre na interação com o domínio Grb2-SH2, onde o resíduo W121 (localizado no sítio II) age como uma barreira, dificultando a interação pY+3. Assim, o domínio Grb2-SH2 seleciona preferencialmente sequências de asparagina pY + 2 (Figura 4.2 - B), fazendo com que essa conformação adquira uma conformação fita- β [71-74].

Figura 4.2: Estrutura do domínio SH2 em um complexo com fosfopeptídeo. (A) Representação em cartoon do domínio LNK-SH2 com as fitas- β coloridas em azul claro, as hélices- α em azul escuro e o fosfopeptídeo em cinza, em que este se encontra na forma estendida. (B) Representação em cartoon do domínio Grb2-SH2 no qual as fitas- β coloridas em azul claro, as hélices- α em azul escuro e o fosfopeptídeo em cinza, o mesmo se encontra na conformação fita- β .



Fonte: adaptado do PDB id: 7R8X e 1ZFP.

Apesar das discussões em aberto sobre a conformação fita- β adquirida exclusivamente pelos fosfopeptídeos nas interações com o domínio Grb2-SH2, a superfície de ligação é composta por resíduos altamente conservados, permitindo interações com diversas proteínas sinalizadoras que contenham resíduos de fosfopeptídeo [75].

Devido à alta versatilidade do domínio SH2 em vias de sinalização, ele se torna um alvo de interesse nos estudos de interação com fármacos que têm potencial de inibir vias oncogênicas [60-62]. Uma abordagem para identificar novos potenciais inibidores do domínio Grb2-SH2 é o uso de moléculas naturais. Nesse contexto,

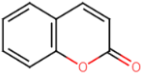
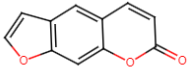
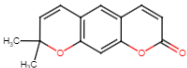
destacam-se as moléculas cumarina e morina, as quais, como mencionado, demonstram afinidade pela interação com esse domínio.

4.3 As moléculas cumarina e morina

Ao longo dos anos, os estudos relacionados à síntese de fármacos com o objetivo de inibir a proliferação descontrolada de células tumorais têm avançado significativamente. A busca por compostos bioativos que apresentam propriedades anticarcinogênicas e de baixa toxicidade, tem se revelado uma alternativa cada vez mais promissora [76-79]. Essas substâncias, frequentemente encontradas com facilidade devido à sua biodisponibilidade, possuem propriedades capazes de inibir o crescimento de células cancerígenas, induzir a apoptose e suprimir a angiogênese em células cancerígenas [80-85].

Uma dessas moléculas, a 1,2-benzopirona, ou popularmente conhecida como cumarina, é uma molécula orgânica que pertence à família dos compostos benzopireno, que consistem em um anel benzeno ligado a um pirano [86]. A classificação das cumarinas ocorre com base nas substituições nos anéis benzeno e pirano, podendo ser classificadas em cumarina simples, furanocumarinas, piranocumarinas e biscumarinas [87]. Esses exemplos podem ser visualizados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Exemplos de cumarinas com suas respectivas estruturas básicas.

Cumarina Simples	
	Apresentam substituições nos anéis benzeno e pirano.
Furanocumarinas	
	Apresentam anel furano junto a estrutura de cumarina simples
Piranocumarinas	
	Apresentam anel pirano junto a estrutura de cumarina simples

Fonte: Adaptado de [87].

As cumarinas possuem uma biodisponibilidade muito grande e estão presentes em sementes, raízes e frutos, principalmente em gimnosperma e angiospermas, como as famílias *Rutaceae* e *Umbelliferae*. Além disso, podem ser encontradas em óleos essenciais, como óleo da casca de canela, óleo da folha de cássia e óleo de lavanda [86,87].

O uso dos compostos cumarínicos têm aumentado consideravelmente ao longo do tempo, devido às suas diversas propriedades farmacológicas como bactericida, anti-inflamatório, anticoagulante, antitrombótico, antioxidante, antitumoral e também atua como potencial agente fotoquimioterápicos. Fármacos contendo cumarina têm demonstrado eficácia terapêutica significativa, baixa toxicidade e efeitos colaterais mínimos [88].

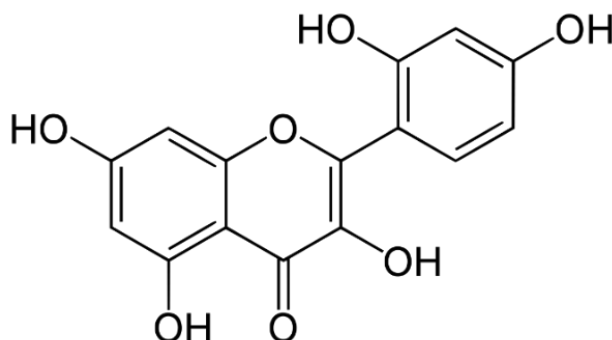
Estudos realizados em modelos animais evidenciou a atividade anticarcinogênica da cumarina na sua forma mais simples, em células prostáticas, apresentando regressão do câncer quando tratados com a molécula [89]. Além disso, estudos *in vitro* observaram a eficácia da molécula na indução da apoptose em adenocarcinoma pulmonar [90]. A cumarina também demonstrou atividade inibitória semelhante ao tamoxifeno, um tipo de tratamento quimioterápico, quando testada em câncer de mama [91,92]. Estes exemplos, entre outras, ressaltam o potencial da molécula, tornando seu estudo importante para a melhora no tratamento do câncer.

Pesquisas preliminares também sugerem que a molécula e seus derivados podem ter efeitos sobre a via MAPK. Estudos *in vitro* com células cancerígenas de ovário e a cumarina 5-Geranioloxi-7-metoxi resultam na inibição da fosforilação de p38/MAPK [93]. Em outro estudo, um derivado de cumarina contendo enxofre demonstrou eficácia contra células de leucemia e de ovário, induzindo a apoptose via ativação da MAPK [94].

Outra molécula em estudo são os flavonoides, uma classe de compostos vegetais amplamente distribuídos na natureza, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Entre os flavonoides, destaca-se a morina (2',3,4',5,7-pentahidroxifavona), presente em várias espécies vegetais, incluído a laranja osage, folhas de goiabeira, folhas de oliveira, no café e no agrião, além de outras espécies de plantas da família *moraceae* [95]. A morina pertence ao subgrupo flavonol, possui uma estrutura molecular única, caracterizada por um anel benzênico

com duas ligações duplas conjugadas e dois grupos hidroxila nas posições C3 e C4, conforme a Figura 4.3 [96].

Figura 4.3: Estrutura da molécula de morina (2',3,4',5,7-pentahidroxifavona). O flavonoide apresenta anel benzênico com duas ligações duplas conjugadas e dois grupos hidroxila nas posições C3 e C4.



Fonte: Adaptado de [96].

Estudos indicam que a morina apresenta propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e anti-hiperglicêmica [97-100]. Também, sugere-se que a molécula possui atividades protetoras significantes contra a toxicidade e efeitos colaterais de diversos medicamentos, sem alterar sua função [102-104]. A morina tem sido objeto de estudos como um agente potencial quimiopreventivo e quimioterápico, demonstrando a capacidade de inibir a proliferação de células cancerígenas, induzir a apoptose e inibir a angiogênese [105-109].

Pesquisas indicam que o efeito anticancerígeno da morina está associado à modulação da cascata de sinalização da via MAPK em células de carcinoma espinocelular oral por meio da ativação de JNK e p38 [110]. Também, a molécula aumenta significativamente a fosforilação de ERK1/2 e atenua a fosforilação de JNK em células de câncer de bexiga [107]. Foi relatado que a sinalização da MAPK está envolvida na citotoxicidade mediada pela morina em células de carcinoma hepatocelular, aumentando a fosforilação de p38 e JNK em células HepG2 [111].

Assim, as moléculas orgânicas, como a cumarina e a morina, detêm um considerável potencial terapêutico. Aprofundar o entendimento da interação entre essas moléculas e domínio Grb2-SH2 pode fornecer informações importantes para pesquisas futuras. Isso, por sua vez, pode colaborar para tratamentos mais eficazes de alguns câncer relacionados a essa via.

4.4 Objetivo

O objetivo deste estudo é aprofundar a compreensão sobre o domínio Grb2-SH2, analisando sua estrutura secundária e estabilidade térmica em condições fisiologicamente relevantes, representadas pelos pHs 7,0 e 8,0. Além disso, buscamos investigar a interação desse domínio com moléculas naturais, como a cumarina e a morina, devido a suas ações antitumorais e de baixa toxicidade, por meio de técnicas como espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, com o intuito de elucidar seus possíveis efeitos e relevância biológica. Dessa forma, propomos nessa parte do trabalho:

1. Realizar a expressão do domínio Grb2-SH2, bem como a sua purificação.
2. Quantificar e caracterizar a estrutura secundária do domínio Grb2-SH2 em pH 7,0 e 8,0.
3. Avaliar a estabilidade térmica do domínio Grb2-SH2 em função do pH.
4. Investigar a interação entre o domínio Grb2-SH2 e as moléculas cumarina e morina por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência em pH 7,0 e 8,0.
5. Analisar a estrutura secundária do domínio Grb2-SH2 na presença das moléculas de cumarina e morina em função do pH.

4.5 Materiais e métodos

4.5.1 Expressão e purificação do domínio Grb2-SH2

O domínio Grb2-SH2 foi expresso em vetor pET28b em bactéria *E.coli* Gold (DE3). As colônias foram cultivadas em meio LB suplementado com o antibiótico Canamicina (50 µg/mL), sob agitação a 100 rpm, a uma temperatura de 37 °C, até atingir uma $DO_{600} = 0,6$. Em seguida, acrescentou-se IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) a uma concentração de 0,4 mM para indução e o cultivo foi mantido por 16 horas a 20 °C.

O meio de cultura foi centrifugado a 3583 xg, durante 40 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl com 100 mM NaCl), complementado com 5 mM de inibidor de protease (P2714-1BTL - Sigma Aldrich®), e posteriormente submetido à lise celular através de sonicação pulsada em 12 ciclos de 40 segundos cada (2 segundos ON e 1 segundo OFF, 40 W). A amostra foi centrifugada a 34.957 xg a 4 °C por 90 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado em membrana de 0,45 µm Minisart.

O processo de purificação manual foi conduzido utilizando uma coluna com resina IMAC HiTrap HP previamente carregada com cobalto, e equilibrada com tampão contendo 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 5 mM Imidazol, a um pH de 8,0. O lisado celular filtrado foi então aplicado à coluna, e a eluição foi realizada por aumento gradual da concentração de Imidazol, variando de 20 mM até 1 M. Amostras foram coletadas em cada etapa da eluição para avaliar a pureza através de eletroforese em gel de poliacrilamida poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

Ademais, as amostras obtidas do processo de purificação por afinidade foram concentradas para um volume de 2mL e injetadas em uma coluna de resina Superdex 75 para a etapa de gel filtração (exclusão molecular), no qual foi retirado resquícios de contaminantes e também promover a troca do tampão. Utilizou-se tampão contendo 20 mM de NaPi com 100 mM de NaCl em pH 7,0 e 8,0. Novamente, o grau de pureza do domínio foi verificado por meio de eletroforese em gel SDS-PAGE 12%.

4.5.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS

A fim de obter a concentração do domínio Grb2-SH2 e das moléculas, efetuaram-se medidas de absorção UV-Vis em espectrofotômetro *Varian Cary® 3E Uv-Visible*. As medidas foram feitas utilizando a faixa de leitura de 250 a 500 nm em temperatura ambiente com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Para o cálculo das concentrações fez-se a subtração do espectro da linha de base do tampão e utilizou o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 13.980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o domínio Grb2-SH2 [112]. A cumarina foi diluída em etanol e a concentração foi medida utilizando $\epsilon_{277} = 11.438 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [113]. Quanto à molécula de morina, sua diluição foi efetuada em DMSO e a concentração foi determinada utilizando $\epsilon_{271} = 16.949 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [114].

4.5.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os experimentos de DSC aplicados ao o domínio Grb2-SH2 foram realizados utilizando o equipamento *N-DSC III (TA Instruments, EUA)* abrangendo uma faixa de temperatura entre 20 e 90 °C, com uma velocidade de varrimento de aquecimento e arrefecimento de 1 °C/min. O domínio Grb2-SH2 foi diluído em tampão contendo 20 mM NaPi e 100 mM NaCl ajustado em pH 7,0 e 8,0, com concentração final de 1,3 mg/ml (150 µM).

Inicialmente, ambas as células calorimétricas foram preenchidas com uma solução tampão, sendo então equilibradas a 20 °C ao longo de 60 minutos. Posteriormente, essas células foram submetidas a varreduras na faixa de temperatura previamente mencionada, até a estabilização da linha de base. Em seguida, a célula destinada à amostra foi preenchida com o domínio Grb2-SH2 e analisada da mesma forma que a solução tampão. As correções da linha de base foram feitas subtraindo as varreduras “tampão-tampão” das correspondentes varreduras “proteína-tampão”, para ambos os pHs.

4.5.4 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

Os procedimentos experimentais foram realizados em um espectropolarímetro *Jasco J-815*, com a finalidade de avaliar a estrutura secundária do domínio SH2 em pH 7,0 e 8,0 na ausência e presença das moléculas. As concentrações foram calculadas para que as proporções molécula:proteína fossem 1:1, 2:1 e 3:1. Utilizando

uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico, os espectros de CD foram coletados na faixa de comprimento de onda de 200 a 250 nm. As medições foram realizadas com uma velocidade de varredura de 50 nm/min, resposta de 1 segundo e 10 acumulações. Os espectros foram adquiridos até que a fotomultiplicadora atingisse a voltagem máxima de 600 V, sob fluxo constante de nitrogênio a 4 L.min⁻¹.

As medidas foram realizadas em ambiente termorregulador a 25 °C, utilizando 15 µM do domínio proteico em solução tampão de 20 mM NaPi com 100 mM NaF e com pH ajustado de acordo com a amostra purificada. Para o cálculo das porcentagens de estruturas secundárias, utilizou-se o programa *online BeStSel* que leva em consideração a orientação e torção das fitas-β e fornece maior precisão em uma ampla variedade de estruturas proteicas, incluindo proteínas ricas em folha-β, proteínas de membrana, proteínas agregadas e fibrilas amilóides [115].

4.5.5 Espectroscopia de fluorescência

Os experimentos de supressão de fluorescência intrínseca do triptofano foram conduzidos com o propósito de investigar possíveis interações entre os complexos SH2-cumarina e SH2-morina em pH 7,0 e 8,0. Para tal, foi utilizado um espectrofluorímetro *ISS PC1 – Champaign II, USA* acoplado a um banho térmico *Nestlab RTE-221 – Thermo Electron Corporation, USA*. Utilizou-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e uma contração de 5µM do domínio Grb2-SH2 em solução tampão 20 mM NaPi, 100 mM NaCl.

As titulações foram executadas em uma faixa que variou de 1 a 15 µM para cada molécula envolvida no estudo. Durante as análises, a excitação das amostras ocorreu na região de 295 nm, seguida por uma varredura de emissão entre 305 nm e 500 nm. Foi utilizada uma abertura de fenda de 1 nm. As medições foram conduzidas a três temperaturas distintas: 288, 298 e 308 K.

A fim de corrigir os efeitos de filtragem interna, foram calculadas as absorbâncias nos comprimentos de onda de excitação e emissão para ambas as moléculas, sendo utilizados para esse propósito $\epsilon_{em} = 7440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{ex} = 2749 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a cumarina, bem como $\epsilon_{em} = 12951 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{ex} = 8260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a morina.

4.6 Resultados e discussões

4.6.1 Parâmetros físico-químicos do domínio Grb2-SH2

Utilizou-se a ferramenta *online ProtParam*, acessível por meio do link <https://web.expasy.org/protparam/>, a fim de adquirir as principais informações físico-químicas teóricas ao domínio Grb2-SH2. Essas informações foram obtidas a partir da sequência de resíduos de aminoácidos utilizada na construção do plasmídeo, sendo os resultados sumarizados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros físico-químicos teóricos do domínio Grb2-SH2. Resultados obtidos através da ferramenta *online ProtParam*.

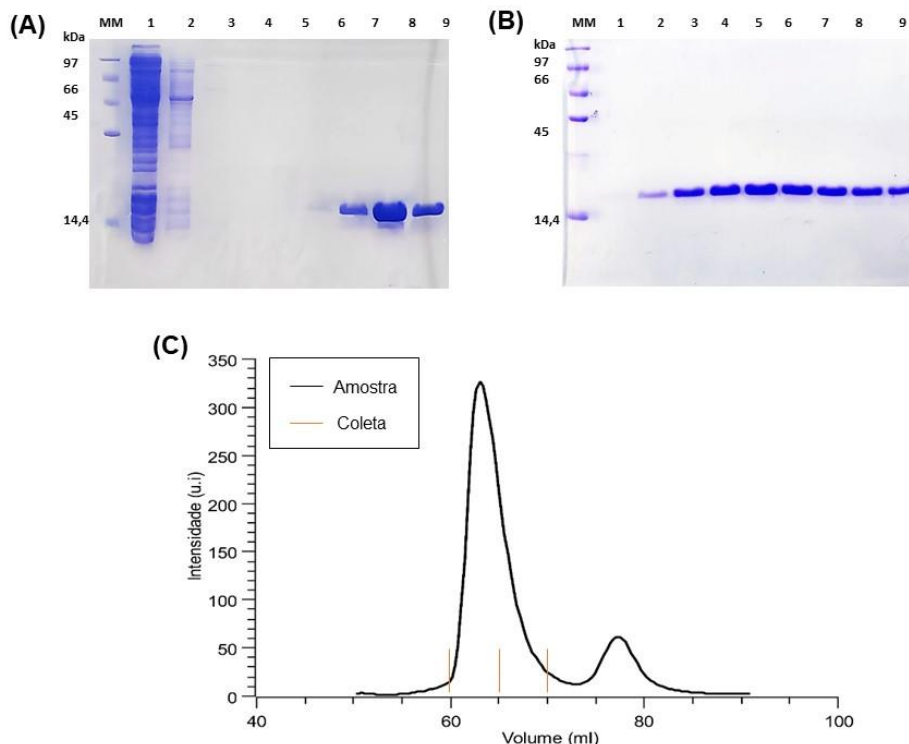
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	Domínio Grb2-SH2
Nº de resíduos de aminoácidos	96
Massa Molecular (kDa)	11,18 kDa
Ponto isoelétrico	9,63
Coeficiente de extinção molar em 280nm ($M^{-1}cm^{-1}$)	13.980

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.6.2 Purificação do domínio Grb2-SH2

A melhor condição para a obtenção do domínio foi expressar durante 16 horas após a indução com 0,4 mM de IPTG a 20 °C e 100 RPM. Após a etapa de sonicação, o filtrado foi submetido a um processo de purificação por afinidade ao cobalto. A eluição foi realizada utilizando concentrações de Imidazol que variaram de 20 mM a 1 M. Para assegurar a pureza da amostra e efetuar a troca de tampão, a purificação por exclusão molecular foi realizada. Amostras foram coletadas no pico principal do cromatograma, correspondendo ao dímero de Grb2-SH2. Os resultados da purificação podem ser visualizados na Figura 4.4, no qual demonstram uma purificação de alta qualidade para o domínio, garantindo a execução adequada dos experimentos propostos neste trabalho.

Figura 4.4: Purificação do domínio Grb2-SH2. (A) SDS-PAGE 12% corado com azul de *comassie* referente à purificação por afinidade em coluna carregada com cobalto. MM) Marcador molecular; 1) *Flow through*; Eluições de 2) 20 mM; 3) 40 mM; 4) 60 mM; 5) 80 mM; 6) 100 mM 7) 200 mM; 8) 500 mM; 9) 1M de Imidazol em solução tampão 50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; (B) SDS-PAGE 12% referente à purificação por gel filtração com eluição em solução tampão 20 mM NaPi pH 7,0 ou 8,0; 100 mM NaCl; (C) Cromatograma referente à purificação por exclusão molecular em ÄKTA Purifier.



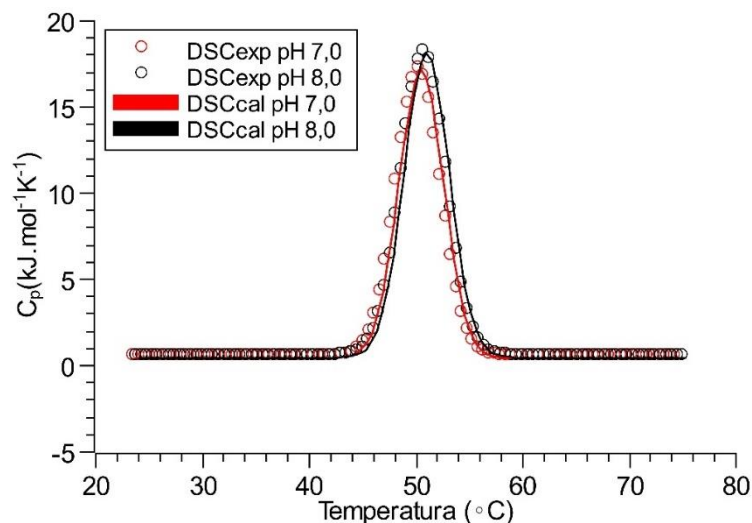
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.6.3 Caracterização do domínio Grb2-SH2 por DSC em pH 7,0 e 8,0

A utilização da técnica de DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura) revelou-se importante para determinar a transição térmica do domínio Grb2-SH2, permitindo estabelecer a temperatura ótima para conduzir os experimentos subsequentes de fluorescência. Essa abordagem nos possibilitou avaliar a estabilidade térmica em relação às mudanças conformacionais do domínio proteico, levando em consideração, a influência exercida pelo pH.

O termograma gerado, que é uma representação gráfica da variação do calor específico à pressão constante em função da temperatura, foi obtido para pH 7,0 e 8,0, conforme demonstrado na Figura 4.5. Ao analisar, torna-se evidente que o domínio Grb2-SH2 exibe uma temperatura de *melting* (T_m) em torno de 51°C, em ambos os valores de pH investigados, indicando uma transição endotérmica entre 47 e 56 °C.

Figura 4.5: Termograma de desnaturação do domínio Grb2-SH2. Análise obtida em 150 μM de Grb2-SH2 em tampão 20 mM NaPi e 100 mM NaCl em pH 7,0 e pH 8,0 a uma velocidade de varrimento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A análise da Figura 4.5 revela que o aumento do pH está associado a uma notável ampliação da região de desnaturação térmica, acompanhada por um deslocamento na temperatura de *melting*, claramente observado na curva gaussiana utilizada para desconvolucionar o termograma. Este fenômeno evidencia um aumento da estabilidade do domínio em questão dentro da faixa de pH alcalino, favorecendo, assim, a preservação de sua estrutura nativa em comparação com valor de pH inferior. Em outras palavras, o domínio Grb2-SH2 mostra-se mais resistente à desnaturação térmica a pH 8,0, conservando sua estrutura em uma amplitude térmica ligeiramente maior.

Além disso, a análise comparativa das entalpias de van't Hoff e calorimétrica sugere que o domínio Grb2-SH2 se comporta como uma proteína de transição de dois estados, como indicado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Parâmetros termodinâmicos do experimento de DSC. Nele consta a temperatura de *melting*, a entalpia calorimetria e a entalpia de van't Hoff para cada pH.

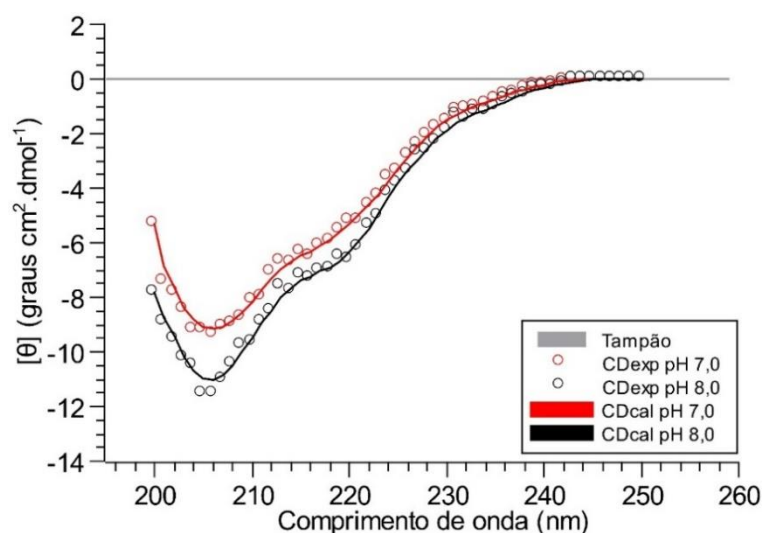
pH	$T_m (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{\text{cal}} (\text{kJ/mol})$	$\Delta H_{\text{vH}} (\text{kJ/mol})$
7,0	50,49 $\pm$ 0,07	89,17 $\pm$ 0,2	98,77 $\pm$ 0,9
8,0	50,98 $\pm$ 0,06	93,58 $\pm$ 0,2	103,56 $\pm$ 0,8

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.6.4 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

Através da análise dos espectros de Dicroísmo Circular (CD), foi possível verificar quaisquer mudanças conformacionais que pudessem surgir em resposta à variação do pH. A comparação dos resultados experimentais foi verificada com a estrutura cristalográfica do domínio disponibilizada pelo PDB (id: 6VK2), o que, por sua vez, direcionou a escolha do programa mais adequado para a análise dos dados. Os espectros de CD, apresentados na Figura 4.6, revelaram um aumento significativo na elipticidade próximo às regiões de 208 e 222 nm para a amostra submetida a pH 8,0. Este fenômeno é uma característica intrínseca das estruturas α -hélice.

Figura 4.6: Espectro de dicroísmo circular do domínio Grb2-SH2 em pH 7,0 e 8,0. O espectro de DC do domínio obtido experimentalmente está representado pelos círculos vermelhos para pH 7,0 e preto para pH 8,0 e o ajuste da curva utilizando o programa *BeStSel*. Dados obtidos com 15 μ M de Grb2-SH2 em tampão 20 mM NaPi e 100 mM NaF. Sendo CDexp os resultados obtidos experimentalmente e CDcalc os dados ajustados pelo *BeStSel*.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para uma abordagem quantitativa, a aplicação do programa *BeStSel* permitiu calcular as porcentagens de diferentes estruturas e identificou um aumento de 3,1% nas estruturas α -hélice, acompanhado por uma diminuição de 0,9% nas estruturas fita- β , no pH 8,0 quando comparado ao pH 7,0. Essas variações percentuais observadas nas estruturas de α -hélice e fita- β , identificadas pelo programa *BeStSel*, sugerem que o pH não provocou mudanças significativas na estrutura secundária do domínio. Os dados podem ser observados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Conteúdo de estrutura secundária do domínio Grb2-SH2. Em relação com o PDB e calculado pelo programa *BeStSel*.

	Previsto	pH 7,0	pH 8,0
α-hélice	11,5%	8,9%	12%
Fita-β	24,3%	21,1%	22%
Outros	64,1%	70%	66%

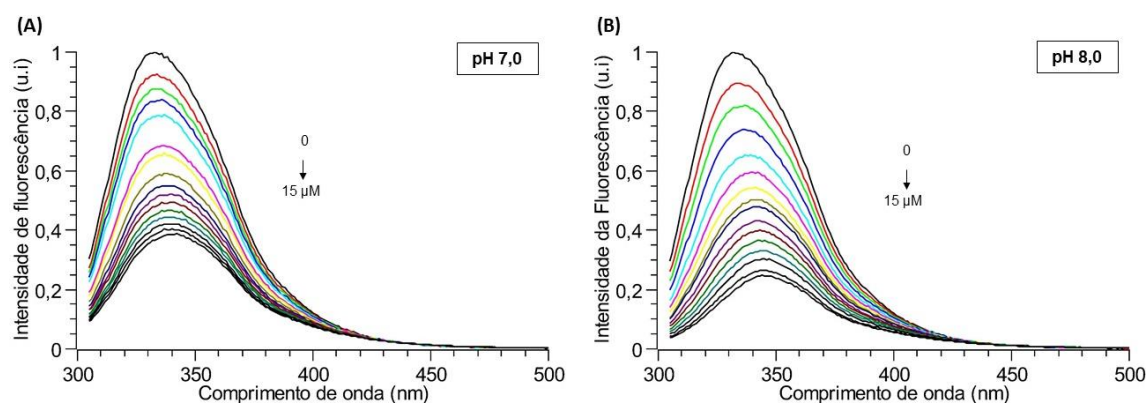
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.6.5 Espectroscopia de fluorescência do domínio Grb2-SH2 e as moléculas de cumarina e morina em pH 7,0 e 8,0

Nesse estudo, investigou-se a interação entre as moléculas e o domínio proteico Grb2-SH2 por meio da análise dos espectros de fluorescência com excitação a $\lambda = 295$ nm, em diferentes concentrações de ligantes e sob variações de pH (7,0 e 8,0), a uma temperatura de 298 K.

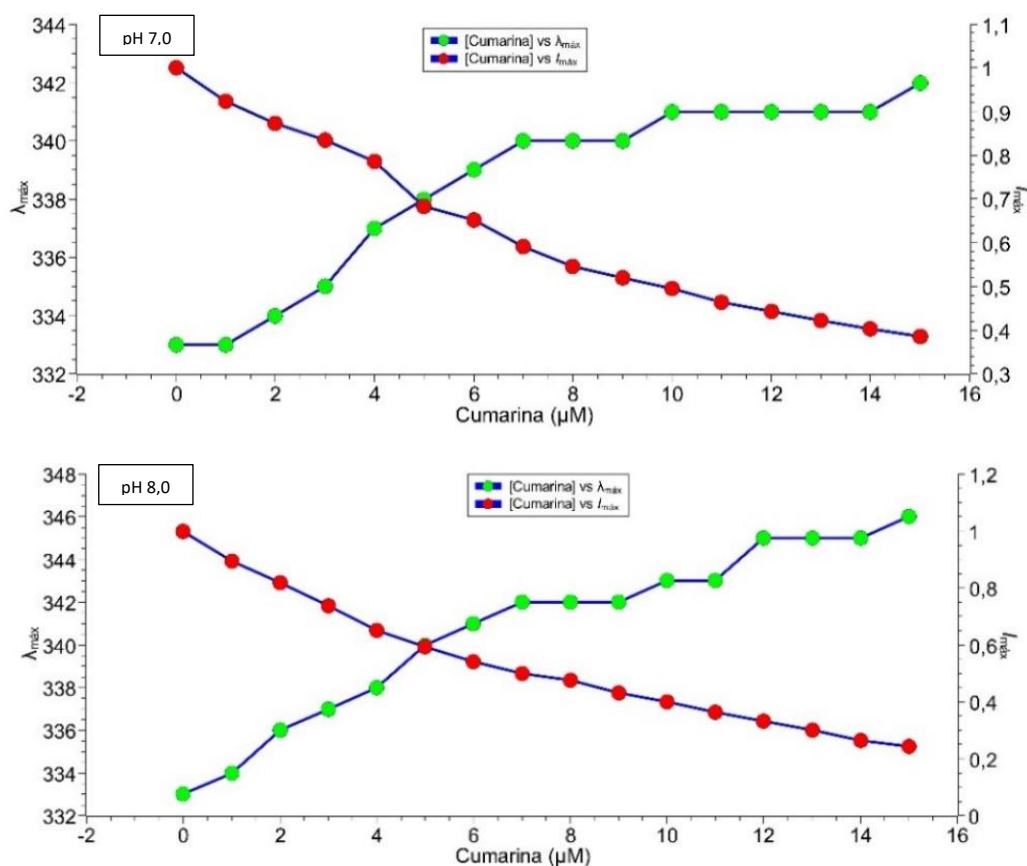
Como representado na Figura 4.7, observa-se uma redução na intensidade de fluorescência do domínio Grb2-SH2 à medida que a concentração de cumarina aumenta. Essa redução sugere a ligação da cumarina ao Grb2-SH2, inibindo a intensidade intrínseca de fluorescência do triptofano, independentemente do pH. Além disso, um desvio para o vermelho (*redshift*) no pico máximo de emissão (λ_{max}), alterando de 333 para 342 nm ($\Delta\lambda = 9$) em pH 7,0 e de 333 para 346 nm ($\Delta\lambda = 13$) em pH 8,0 é observado. A Figura 4.8 ilustra graficamente esse desvio.

Figura 4.7: Espectro de emissão de fluorescência para o complexo SH2-cumarina. A temperatura de 298 K. (A) pH 7,0. (B) pH 8,0.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

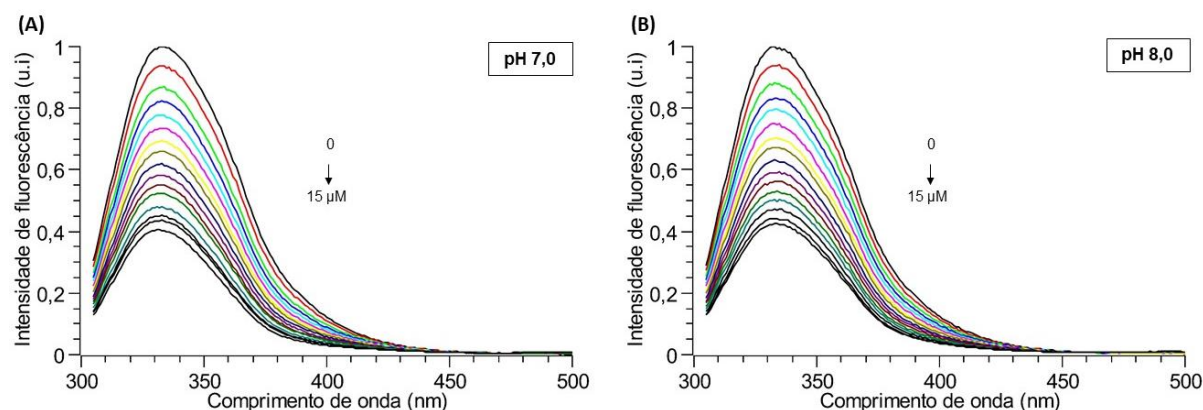
Figura 4.8: Gráfico comparativo para o complexo SH2-cumarina em relação ao comprimento de onda máximo (λ_{max}) (círculos verdes) vs o máximo intensidade (I_{max}) (círculos vermelhos) em função do ligante, para ambos pHs.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

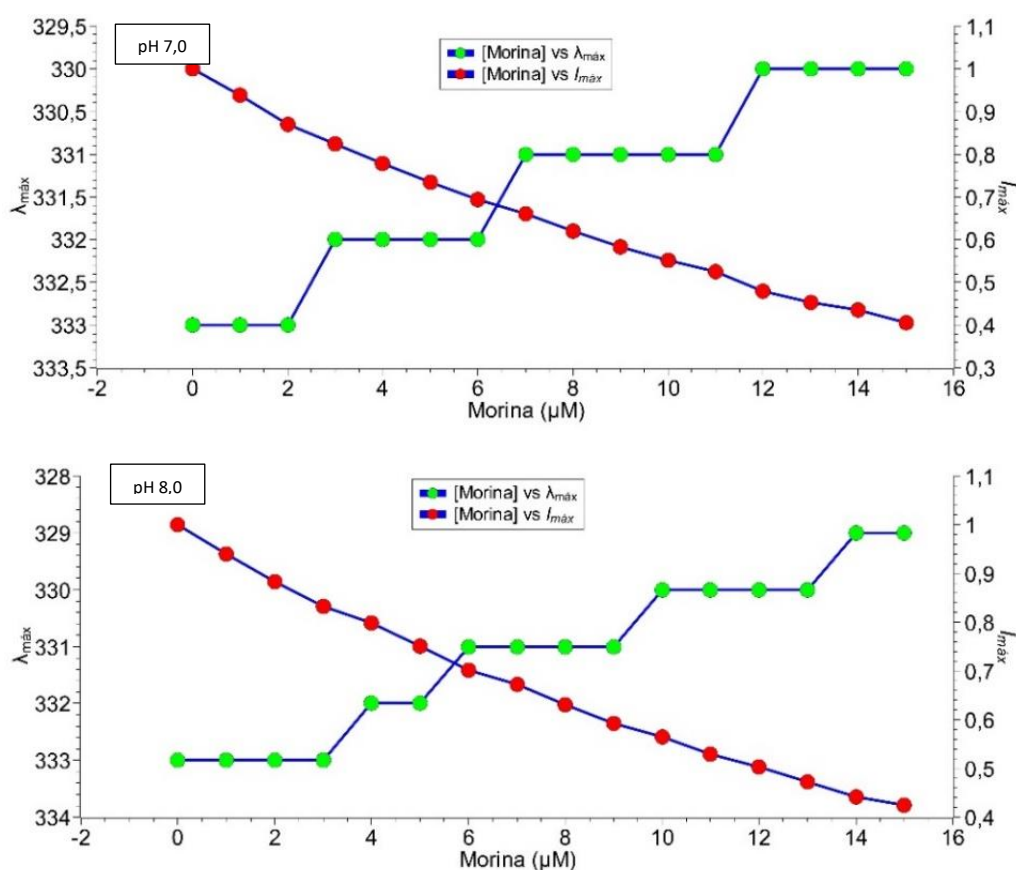
Similarmente, a morina também suprimiu a fluorescência com o aumento de sua concentração, interagindo com os resíduos de triptofano do domínio Grb2-SH2. Observamos um desvio no pico máximo de emissão (λ_{max}), alterando de 333 para 330 nm ($\Delta\lambda = 3$) em pH 7,0 e de 333 para 329 nm ($\Delta\lambda = 4$) em pH 8,0, conforme representado na Figura 4.9. A Figura 4.10 demonstra o desvio para o azul (*blueshift*) nos espectros de fluorescência com o aumento da titulação do ligante em ambos os pHs.

Figura 4.9: Espectro de emissão de fluorescência para o complexo SH2-morina. A temperatura de 298 K. (A) pH 7,0. (B) pH 8,0.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 4.10: Gráfico comparativo para o complexo SH2-morina em relação ao comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) (círculos verdes) vs o máximo intensidade ($I_{\text{máx}}$) (círculos vermelhos) em função do ligante, para ambos pHs.



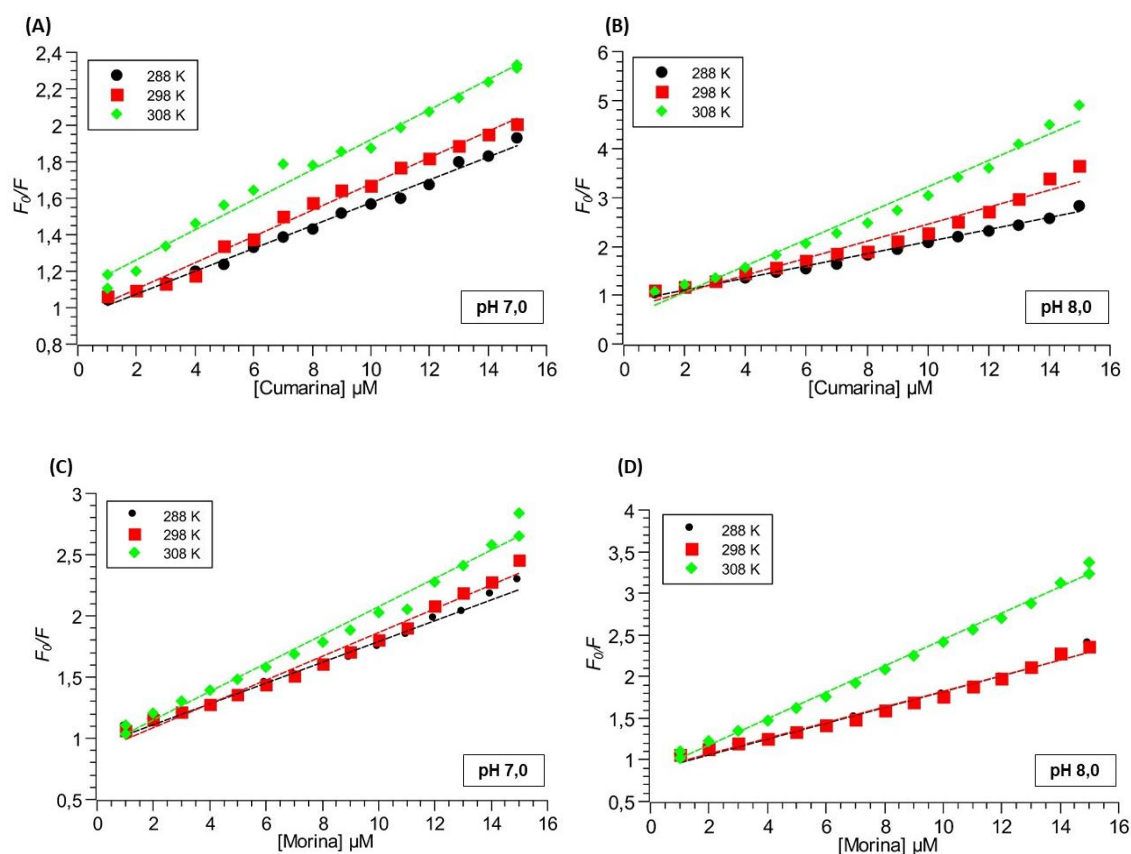
Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Esses deslocamentos nos picos de emissão indicam que os resíduos de triptofano presentes na superfície do Grb2-SH2 estavam em um ambiente mais polar

e exposto ao solvente na presença da cumarina, enquanto estavam em um ambiente mais hidrofóbico e menos exposto ao solvente na presença da morina.

Para determinar o mecanismo de supressão, procedemos à análise dos dados de fluorescência por meio da equação de Stern-Volmer, conforme descrito na seção 2.5 deste estudo. A análise (Figura 4.11, Tabela 4.5) revelou que o complexo SH2-cumarina exibe uma constante de Stern-Volmer maior em pH 8,0 em comparação ao pH 7,0, indicando uma maior eficácia do processo em condições mais alcalinas. Essa observação pode ser atribuída a várias razões, incluindo aumento da reatividade e melhor acessibilidade do ligante, possíveis mudanças nas propriedades do fluoróforo e/ou alterações na estrutura molecular [49].

Figura 4.11: Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência do domínio Grb2-SH2 nas temperaturas de 288 (preto), 298 (vermelho) e 308 K (verde), pelos ligantes cumarina e morina. (A) Complexo SH2-Cumarina, pH 7,0. (B) Complexo SH2-Cumarina, pH 8,0. (C) Complexo SH2-Morina, pH 7,0. (D) Complexo SH2-Morina, pH 8,0.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 4.5: Valores obtidos para a constante de Stern Volmer (K_{SV}). O aumento proporcional em relação à temperatura indica que a supressão de fluorescência ocorre através do mecanismo dinâmico.

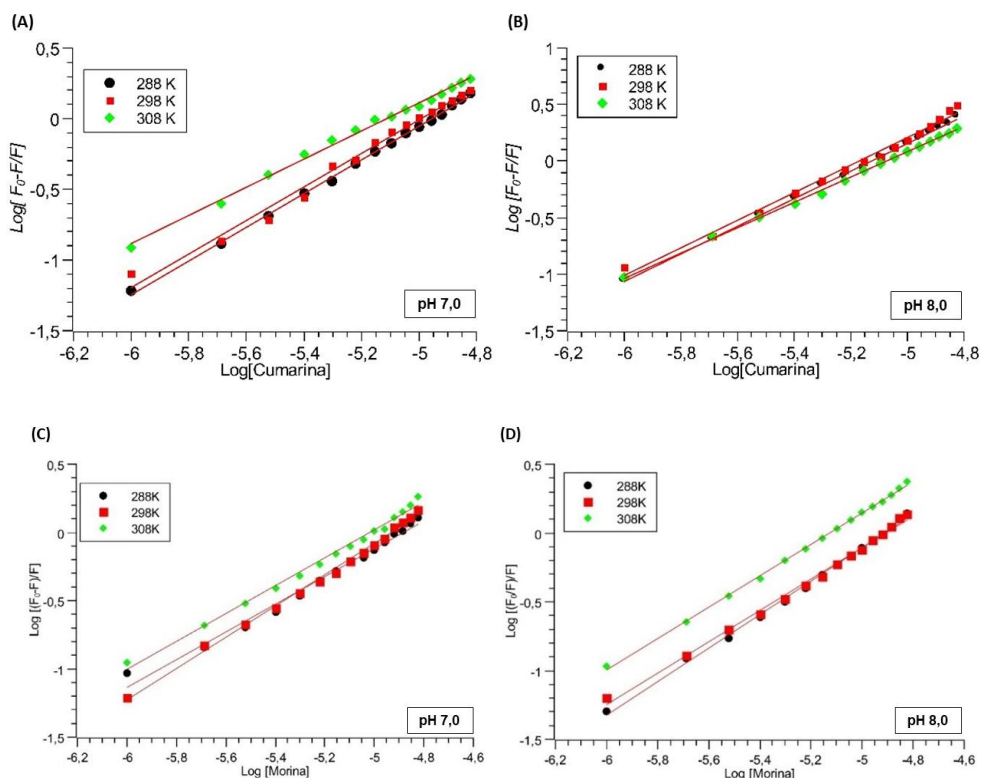
Cumarina					
	T (K)	K _{SV} (x10 ⁷ M ⁻¹)		T (K)	K _{SV} (x10 ⁸ M ⁻¹)
pH 7,0	288	5,5±0,02	pH 8,0	288	1,0±0,02
	289	6,5±0,02		289	1,4±0,02
	308	7,2±0,04		308	2,0±0,02
R = 0,919 (coeficiente de correlação)			R = 0,908 (coeficiente de correlação)		
Morina					
	T (K)	K _{SV} (x10 ⁷ M ⁻¹)		T (K)	K _{SV} (x10 ⁷ M ⁻¹)
pH 7,0	288	4,4±0,02	pH 8,0	288	4,8±0,04
	289	5,1±0,03		289	4,9±0,03
	308	6,0±0,04		308	8,3±0,03
R = 0,960 (coeficiente de correlação)			R = 0,960 (coeficiente de correlação)		

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Além disso, os resultados obtidos mostram um aumento proporcional dos valores à medida que a temperatura foi elevada, sugerindo que a diminuição da viscosidade do meio facilitou a livre movimentação das moléculas no sistema. Isso, por sua vez, mostra uma intensidade das colisões entre a molécula e o fluoróforo. Com base nesses valores, podemos classificar o mecanismo de supressão como dinâmico [49].

Também, a partir dos dados de supressão da fluorescência, foi possível determinar a constante de ligação (K_b) e do número de sítios de ligação (n) por complexo em diferentes temperaturas (288, 298 e 308 K), conforme ilustrado na Figura 4.12 e detalhado na Tabela 4.6. Observa-se que a relação ligante-proteína foi estabelecida como 1:1, indicando que cada domínio possui um ligante associado. Além disso, a constante K_b foi determinada como sendo moderada, na ordem de $10^5 M^{-1}$ para pH 7,0, e um aumento significativo em pH 8,0 para a cumarina. Em relação à morina, a constante de ligação permaneceu moderada, na ordem de $10^5 M^{-1}$, independentemente do pH.

Figura 4.12: Gráfico duplo logarítmico. (A) Complexo SH2-cumarina, pH 7,0. (B) Complexo SH2-cumarina, pH 8,0. (C) Complexo SH2-morina, pH 7,0. (D) Complexo SH2-morina, pH 8,0.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 4.6: Constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) da interação.

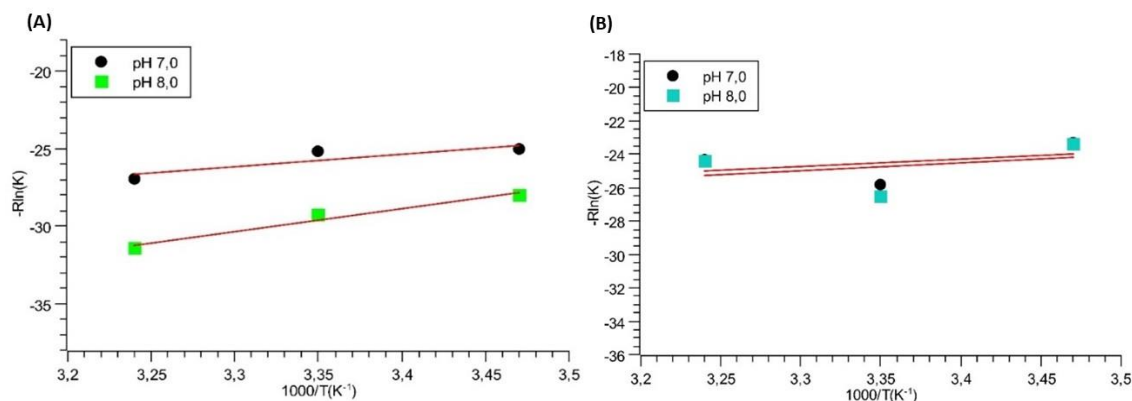
Cumarina							
pH 7,0	T (K)	K _b (x10 ⁵ M ⁻¹)	n	pH 8,0	T (K)	K _b (x10 ⁶ M ⁻¹)	n
	288	3,0±0,01	1,1±0,01		288	1,2±0,01	1,2±0,01
	298	3,1±0,01	1,1±0,01		298	2,5±0,01	1,2±0,01
	308	5,9±0,02	1,1±0,01		308	6,3±0,01	1,4±0,01
R = 0,988 (coeficiente de correlação)				R = 0,966 (coeficiente de correlação)			
Morina							
pH 7,0	T (K)	K _b (x10 ⁵ M ⁻¹)	n	pH 8,0	T (K)	K _b (x10 ⁵ M ⁻¹)	n
	288	1,2±0,02	1,0±0,01		288	1,2±0,03	1,0±0,01
	298	4,4±0,01	1,1±0,01		298	6,1±0,02	1,1±0,01
	308	1,4±0,01	1,0±0,01		308	2,1±0,02	1,0±0,01
R = 0,966 (coeficiente de correlação)				R = 0,966 (coeficiente de correlação)			

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Uma vez obtida a constante de ligação, a equação de van't Hoff (equação 23) foi utilizada para determinar o perfil termodinâmico da interação entre os complexos

em ambos os pHs. O gráfico de van't Hoff pode ser visualizado na Figura 4.13, e os valores dos parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) estão disponíveis na Tabela 4.7.

Figura 4.13: Gráfico de van't Hoff. (A) Representa o complexo SH2-cumarina. (B) Representa o complexo SH2-morina.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 4.7: Parâmetros termodinâmicos para os complexos SH2-cumarina e SH2-morina. Valores obtidos pela equação de van't Hoff referentes nas temperaturas de 288, 298 e 308K.

Cumarina				
pH	Temperatura (k)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
7,0	288	-7,1±1,4	8,2±1,2	-15,3±0,9
	298	-7,6±0,8		-15,9±0,8
	308	-8,2±0,6		-16,4±0,9
8,0	288	-20,4±0,8	2,3±0,5	-22,7±0,9
	298	-21,2±0,9		-23,5±1,2
	308	-22,0±0,8		-24,3±1,2
Morina				
pH	Temperatura (k)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
7,0	288	-6,8±1,4	4,4±1,5	-11,3±0,9
	298	-7,2±1,1		-11,7±0,6
	308	-7,6±1,1		-12,1±0,9
8,0	288	-6,9±1,5	4,8±2,0	-11,7±1,1
	298	-7,3±1,5		-12,1±1,4
	308	-7,7±1,8		-12,5±1,1

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com base nos resultados obtidos, nota-se que a variação de entalpia permanece constante em ambos os complexos, como evidenciado na Tabela 4.7, uma

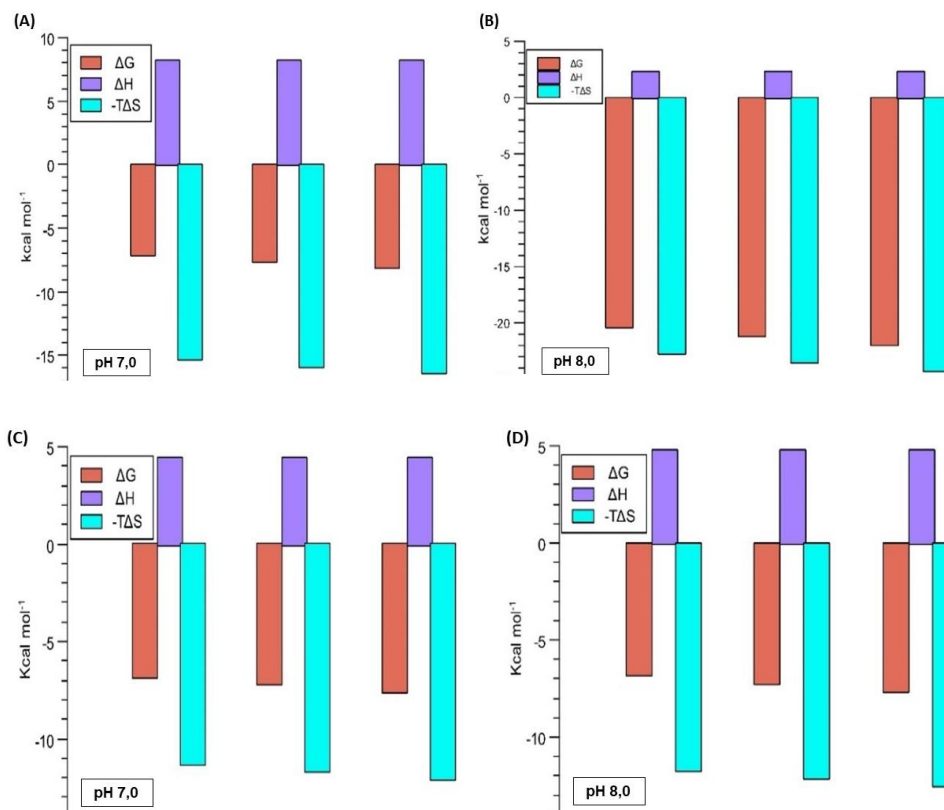
vez que o intervalo de temperatura estudado não apresenta variações significativas. Em relação aos valores da energia livre de Gibbs (ΔG), ambos complexos apresentam valores negativos, indicando que a interação entre o domínio e as moléculas ocorre espontaneamente em pHs 7,0 e 8,0.

Notavelmente, o complexo SH2-cumarina mostrou um ΔG maior em pH 8,0, sugerindo que a interação se tornou mais favorável nessas condições. Esse fenômeno pode ser atribuído a uma combinação de fatores, incluindo possíveis alterações nas concentrações de espécies ionizáveis, variações nas cargas superficiais e possíveis mudanças na estrutura molecular. Essas mudanças podem influenciar na espontaneidade da interação, tornando-a mais favorável em pH 8,0 em comparação com pH 7,0.

Além disso, as contribuições entálpicas e entrópica são positivas, ou seja, $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, o que sugere que as interações são predominantemente impulsionadas por fatores entrópicos, caracterizando uma interação de natureza hidrofóbica. Esses resultados são coerentes com a natureza apolar das moléculas usadas como ligantes. Dado que o domínio está imerso em um solvente polar, as moléculas de cumarina e morina tendem a se acomodar em uma região de bolso hidrofóbico presente no domínio. Com isso, se induz uma leve mudança conformacional no domínio, expondo fragmentos apolares do seu interior ao solvente. Como resultado, ocorre a reorganização das moléculas de água do solvente ao redor do domínio e dos ligantes, aumentando a entropia. A aproximação de superfícies hidrofóbicas promove a desorganização da camada de solvatação, favorecendo a interação [112,114].

A seguir, apresentamos uma representação do perfil termodinâmico dos sistemas investigados na Figura 4.14.

Figura 4.14: Perfil termodinâmico dos complexos estudados em ambos os pHs. Em rosa tem-se representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em roxo a variação de entalpia (ΔH) e em azul a variação de entropia ($-T\Delta S$). A partir desse perfil, pode-se identificar o tipo de interação predominante na formação dos complexos. (A) Perfil termodinâmico do complexo SH2-cumarina, pH 7,0. (B) Perfil termodinâmico do complexo SH2-cumarina, pH 8,0. (C) Perfil termodinâmico do complexo SH2-morina, pH 7,0. (D) Perfil termodinâmico do complexo SH2-morina pH 8,0.



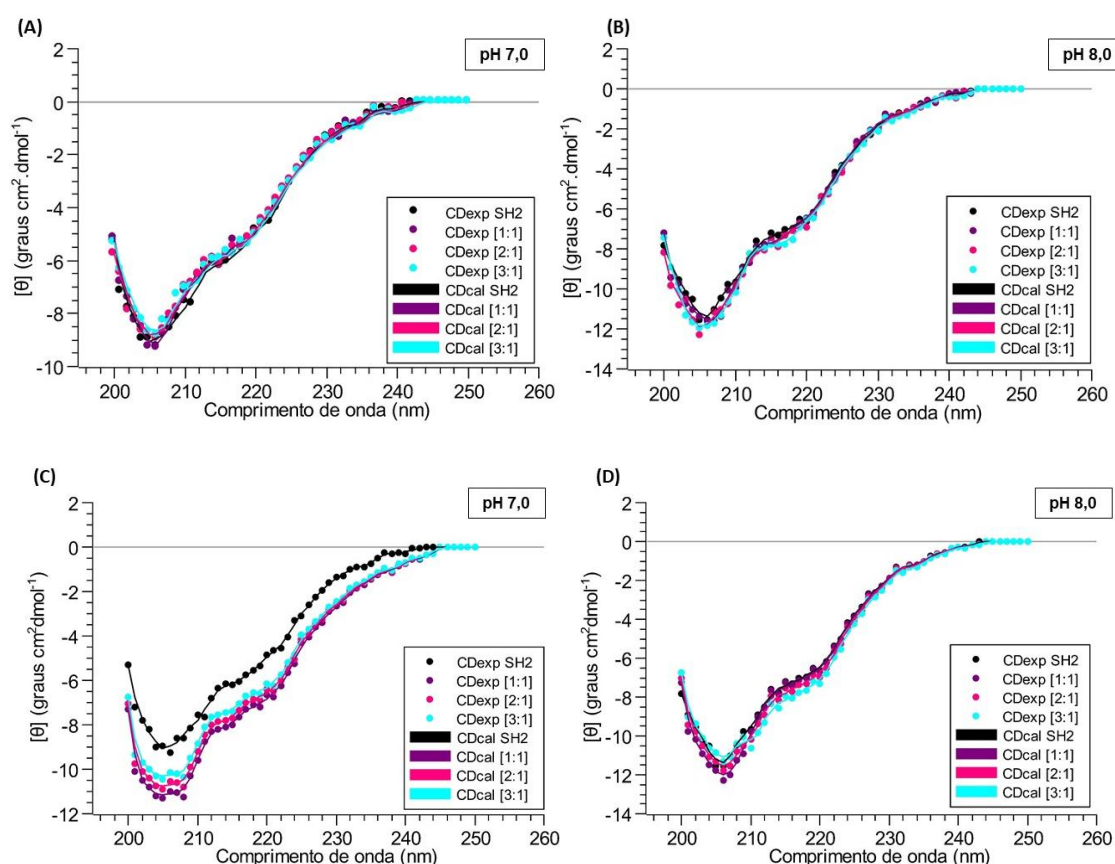
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os ensaios conduzidos com o domínio Grb2-SH2 corroboram com as pesquisas realizadas previamente pelo nosso grupo com o dímero da Grb2 e às moléculas cumarina e morina. Nesse contexto, o perfil de interação apresentou um mecanismo de supressão dinâmico e estático, sendo a supressão dinâmica predominante devido ao aumento de temperatura do sistema, igualmente apresentado pelo estudo com o dímero de Grb2. Além disso, a natureza da interação também foi caracterizada como hidrofóbica e moderada, com uma constante de ligação 10^5 M^{-1} e uma razão molecular de 1:1 para ambas as moléculas. Isso reforça a ideia de que a ligação entre as moléculas ocorre por meio do domínio Grb2-SH2.

4.6.6 Espectropolarimetria de dicroísmo circular na presença das moléculas cumarina e morina em pH 7,0 e 8,0

Com o intuito de investigar as possíveis mudanças na estrutura secundária do domínio Grb2-SH2 induzidas pelas moléculas de cumarina e morina. Para tal análise, foram conduzidas medidas de espectropolarimetria de dicroísmo circular em condições de pH 7,0 e 8,0, conforme representado na Figura 4.15.

Figura 4.15: Espectro de dicroísmo circular do domínio Grb2-SH2 na presença das moléculas cumarina e morina. Experimento realizado nas proporções ligante:domínio [1:1], [2:1] e [3:1] em pH 7,0 e 8,0. (A) Complexo SH2-cumarina, pH 7,0. (B) Complexo SH2-cumarina, pH 8,0. (C) Complexo SH2-morina, pH 7,0. (D) Complexo SH2-morina, pH 8,0.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Na condição de pH 7,0, observou-se um aumento percentual de 2,1% em estruturas α -hélices e 2,8% em fitas- β com o incremento da concentração do ligante cumarina. Simultaneamente, uma redução de 4,9% foi identificada nas estruturas desordenas induzidas pela molécula de cumarina. No caso da molécula de morina, também em pH 7,0 foi verificado um acréscimo de 7,1% e 4,1% em fitas- β , respectivamente.

Com relação ao pH 8,0, observou-se uma diminuição de 7% nas estruturas α -hélices e um aumento de 3,2% nas fitas- β na presença da cumarina. Adicionalmente, um aumento de 3,8% foi identificado nas estruturas desordenadas. No caso da molécula de morina, constatou-se uma diminuição de 3,6% nas estruturas α -hélices e um aumento de 7,7% nas fitas- β .

Os resultados evidenciam que tanto o aumento da concentração do ligante quanto a variação do pH afetaram de maneira distinta a estrutura secundária do domínio Grb2-SH2. Notavelmente, as alterações estruturais mais significativas foram observadas em pH 8,0. Todos os valores obtidos estão detalhados na Tabela 4.8 para referência adicional.

Tabela 4.8: Valores da estrutura secundária do domínio Grb2-SH2 na presença das moléculas cumarina e morina. Análise feita pelo programa *online BeStSel*, na presença de diferentes concentrações das moléculas, em pH 7,0 e 8,0.

Cumarina				
pH	Concentração ligante:SH2	α -Hélice	Fita- β	Outros
7,0	[1:1]	9%	21,9%	69,1%
	[2:1]	11%	22,3%	66,7%
	[3:1]	11,1%	24,7%	64,2%
8,0	[1:1]	13,7%	18%	68,3%
	[2:1]	7%	20%	73%
	[3:1]	6,7%	21,2%	72,1%
Morina				
pH	Concentração ligante:SH2	α -Hélice	Fita- β	Outros
7,0	[1:1]	11,8%	19,2%	69%
	[2:1]	19%	25,3%	55,7%
	[3:1]	18,9%	23,3%	58,7%
8,0	[1:1]	15,6%	25,4%	59%
	[2:1]	14,5%	26,1%	60,4%
	[3:1]	12%	33,1%	54,9%

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.7 Conclusão

Na presente etapa do estudo, destacamos a caracterização do domínio Grb2-SH2 e a sua interação com as moléculas cumarina e morina, considerando a variação do pH.

Uma parte fundamental deste estudo consistiu em avaliar a influência do pH na estrutura secundária e na estabilidade térmica do domínio Grb2-SH2. Nossas análises por dicroísmo circular evidenciaram que o pH não interfere na estrutura secundária do domínio. No entanto, a caracterização por DSC revelou que o aumento do pH está correlacionado com uma expansão significativa na região de desnaturação térmica, resultando em uma mudança na temperatura de *melting*. Além disso, ao compararmos as entalpias de van't Hoff e calorimétrica, observamos que o domínio Grb2-SH2 segue um padrão típico de transição entre dois estados.

Os resultados obtidos pela supressão de fluorescência indicaram uma interação favorável, entropicamente dirigida e guiada por efeitos hidrofóbicos ($\Delta G < 0$; ΔH e $\Delta S > 0$) para ambas as moléculas, tanto em pH 7,0 quanto 8,0, com uma constante de afinidade de ordem moderada e na proporção de um ligante por proteína.

As análises por dicroísmo circular do domínio na presença das moléculas revelaram um aumento nas porcentagens de α -hélices e fitas- β em ambos os pHs, sendo as alterações estruturais mais pronunciadas observadas em pH 8,0.

Com base nesses resultados, é evidente que o domínio Grb2-SH2 apresenta uma sensibilidade na conformação estrutural diante da variação de pH, influenciando na interação com as moléculas antitumorais cumarina e morina, ainda que mais experimentos sejam necessários para comprovar tais mudanças estruturais.

Ainda assim, essas informações poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, destacando a importância de estudar o domínio em diferentes condições de pH para compreender seu comportamento e suas interações em contextos fisiológicos e terapêuticos.

5. CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA GRB2^{Y160F} E O DNA G-QUADRUPLEX

5.1 Via de reparo de DNA

A instabilidade genômica, o aumento da proliferação e a evasão da apoptose são uma das características das células cancerígenas. As alterações na estrutura do DNA ocorrem frequentemente ao longo do ciclo celular, sendo consequência a exposição de agentes exógenos ou como influência de agentes endógenos. Essas alterações no material genético podem desencadear mutações, as quais, por sua vez, têm o potencial de acarretar diversos tipos de câncer [116,117].

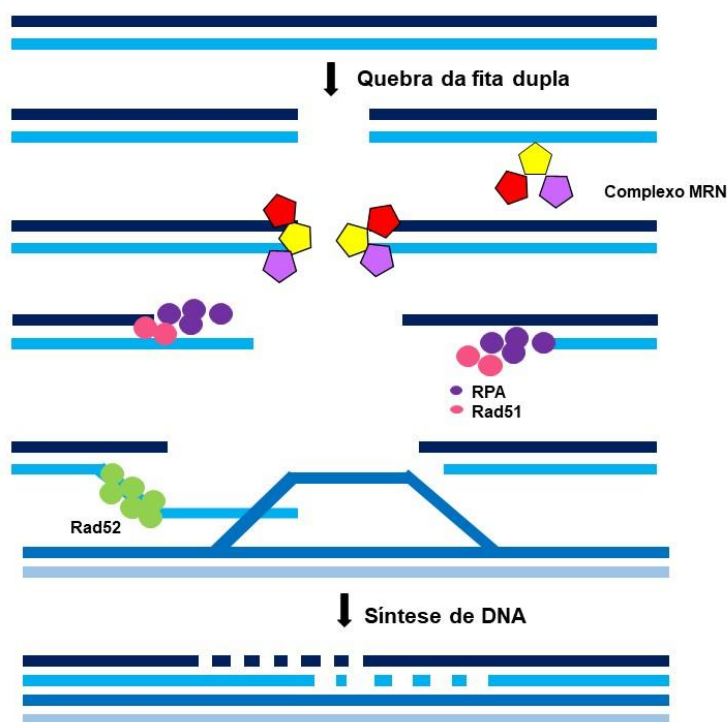
Entre as alterações do DNA, as quebras na dupla fita (DSBs) tendem ocasionar a perda de informação genética, instabilidade genômica e ativar mecanismos de morte celular quando não são devidamente reparadas [118]. O reparo por recombinação homóloga (HR) é o principal mecanismo empregado para reparar DSBs durante o processo de replicação do DNA. Este processo utiliza uma sequência genética homóloga como modelo para reconstituir, com precisão, a sequência afetada pela quebra na dupla fita de DNA [119]. Na maioria dos casos, a região homóloga presente na cromátide irmã é utilizada como molde para correção da quebra na fita dupla, minimizando possíveis erros e perdas e, consequentemente, garantindo uma reparação mais precisa [120].

A recombinação homóloga ocorre somente durante as fases S e G2 do ciclo celular, quando o cromossomo homólogo está disponível para servir como molde de DNA. Esta via de reparo está diretamente associada à resolução de DSBs resultantes do colapso da forquilha de replicação durante a replicação do DNA em células somáticas, sendo crucial na preservação da integridade genômica [121].

Como mencionado, o complexo MRN, composto por Mre11, Rad 50 e Nbs1, ativa a via de recombinação homóloga ao reconhecer DSBs, ativando a cinase ATM e recrutando-a para o local da quebra [122]. Posteriormente, endonucleases clivam as extremidades das fitas de DNA, gerando terminais 3' de fita simples (ssDNA) os quais são estabilizados pela ligação da proteína RPA [123]. O próximo passo da via consiste na formação dos filamentos capazes de invadir a cromátide irmã, e a proteína BRCA2 facilita a substituição de RPA por RAD51, uma proteína que desempenha

papel central na via, uma vez que é responsável pela formação dos filamentos de nucleoproteínas necessários para a invasão e a busca por regiões homólogas [124]. A invasão leva à formação de uma estrutura D-loop, a partir da qual o reparo pode seguir através da formação de junções de *Holiday* ou de um modelo que finaliza o reparo sem este tipo de junção [119]. Ao encontrar a região homóloga, a Pol δ é recrutada para finalizar o reparo [125]. Um esquema representativo dessa via pode ser observado na Figura 5.1.

Figura 5.1. Esquema da via de recombinação homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA. A ativação da via de recombinação homóloga inicia-se com o complexo MRN reconhecendo a DSB. Isso desencadeia a ativação da cinase ATM e a recrutamento da endonuclease para gerar terminais 3' de ssDNA, estabilizados pela RPA. A proteína BRCA2 facilita a substituição de RPA por RAD51, crucial na formação dos filamentos para invadir a cromátide irmã. A formação do D-loop permite o reparo através de junções de *Holiday* ou um modelo alternativo, finalizando o reparo ao encontrar a região homóloga.



Fonte: Adaptado de [119].

Diversos fatores, sejam exógenos e endógenos, desencadeiam lesões no DNA, incluindo exposições a agentes físicos, químicos, erros de replicação, hidrólise de bases em depurinação ou depirimidinação, exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs) que provocam oxidação e quebra do DNA, bem como a formação de estruturas secundárias no DNA [126-129].

Estas estruturas secundárias, como o DNA G-quadruplex, durante a reparação por HR, possuem potencial para causar paradas na forquilha de replicação e,

potencialmente, originar quebras na dupla fita do DNA, contribuindo para a instabilidade genômica e possivelmente para o desenvolvimento de patologias [40].

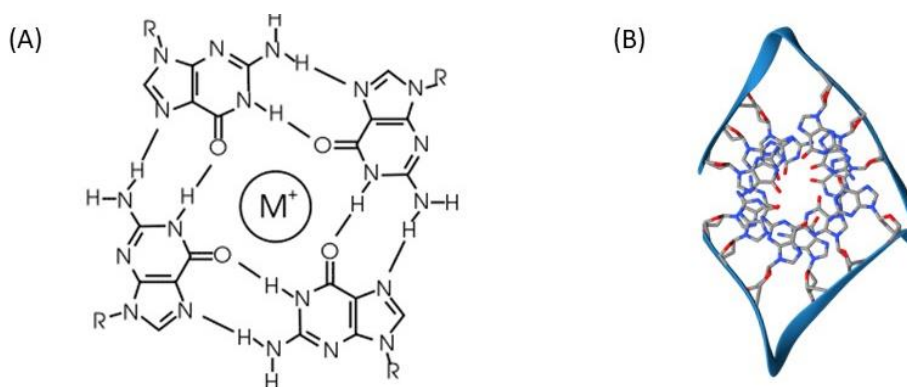
Para contornar este problema, tem sido investigado a busca por compostos estabilizadores ou inibidores das estruturas de DNA G-quadruplex. Entre eles, as proteínas envolvidas na via de reparo por homologia [130]. É relevante ressaltar que a proteína Grb2 tem a capacidade de recrutar a proteína Mre11 para locais de danos no DNA de maneira eficaz [22]. Embora ainda não exista evidências concretas sobre a interação entre a proteína Grb2 e estruturas secundárias de DNA, explorar novas perspectivas nessa área é de grande interesse para obter contribuições mais significativas para a integridade do genoma.

Estudos sobre essa interação são fundamentais para a compreensão da patogênese de doenças associadas à instabilidade genômica, o desenvolvimento de novas terapias e a elucidar os mecanismos subjacentes à regulação da replicação do DNA e à manutenção da estabilidade do genoma [40].

5.2 DNA G-quadruplex

O DNA G-quadruplex são estruturas nucleicas não canônicas, formadas por quatro fitas, que surgem em sequências ricas em guanina, organizadas em tétrades ligadas por pontes de hidrogênio do tipo Hoogsteen (Figura 5.2). A formação de um G-quadruplex é viabilizada pelo empilhamento de três quartetos de guanina, estabilizados por cátions monovalentes (Na^+ ou K^+) [130,131].

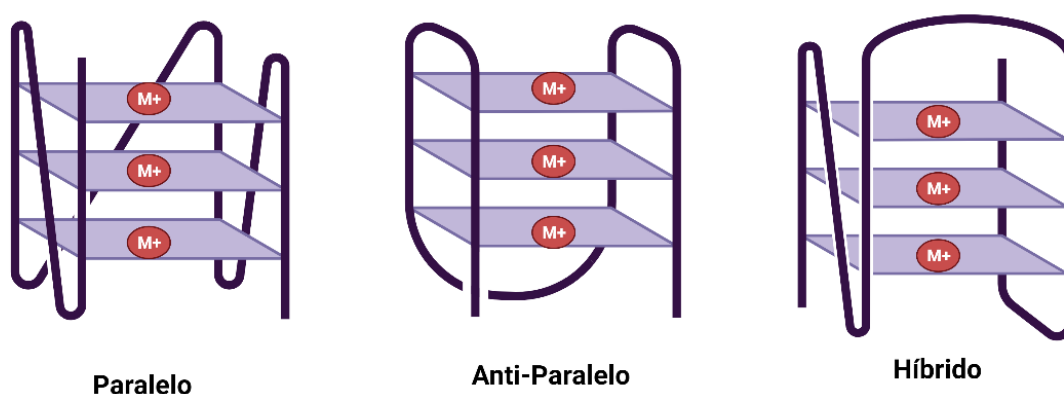
Figura 5.2: Representação de um DNA G-quadruplex. (A) A imagem mostra a associação entre guaninas formando um G-tétrede, sendo M^+ o cátion monovalente (B) Imagem em cartoon de uma estrutura G-quadruplex.



Fonte: Adaptado de [130].

Esses G-quadruplex podem adotar uma ampla variedade de conformações, as quais são influenciadas pelo tamanho e sequência das alças intermediárias. Essas conformações são classificadas como paralelas, antiparalelas e híbridas, sendo ilustradas na Figura 5.3. Esta diferenciação implica em notáveis variações em sua estabilidade e propriedades moleculares. Estima-se que existam mais de 300.000 locais com potencial para a formação de estruturas de DNA G-quadruplex em genomas humanos [132].

Figura 5.3: Representação das três conformações classificadas como paralelas, antiparalelas e híbridas.



Fonte: Adaptado de [130] - criado com *Biorender*.

A localização dessas estruturas de DNA não é aleatória, mas sim específica, concentrando-se em regiões genômicas como telômeros, locais de início da transcrição e locais de quebras de dupla fita de DNA (DSBs) [133,134]. Além disso, estudos *in vivo* evidenciam a ocorrência de formação de DNA G-quadruplex em processos celulares fundamentais, como transcrição de DNA, tradução e manutenção de telômeros [132,135].

Certas proteínas desempenham um papel importante na formação dessas estruturas [136] e dependendo da localização, a formação de G-quadruplexes pode desencadear instabilidade no genoma, afetando a transcrição gênica, causando interrupções na forquilha de replicação ou induzindo mutações [137-140].

5.3 OBJETIVO

As estruturas secundárias de DNA, especialmente o G-quadruplex, são reconhecidas pelo seu potencial em desencadear a instabilidade do genoma. Sabe-se que a localização da Grb2 no núcleo foi relatada há algum tempo, e recentemente foi observado a interação da Grb2 com a proteína Mre11, formando o complexo GM, importante para o reparo na quebra da fita dupla de DNA. Com o intuito de explorar uma possível nova função, este estudo teve como objetivo investigar a interação da proteína Grb2 com o DNA G-quadruplex. Assim, o presente trabalho propõe:

1. Realizar a expressão e a purificação da proteína Grb2 mutante Y160F, conhecida por favorecer o estado monomérico.
2. Preparar e verificar as estruturas de DNA G-quadruplex.
3. Investigar a interação entre a proteína Grb2^{Y160F} e duas diferentes sequências de DNA G-quadruplex utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência.

5.4 Materiais e métodos

5.4.1 Expressão e purificação da proteína Grb2^{Y160F}

A proteína Grb2^{Y160F} foi expressa em vetor pET28b em bactéria *E.coli Gold* (DE3). As colônias foram cultivadas em meio de cultura LB com adição de Canamicina (50 µg/mL) sob agitação de 100 rpm, a 37 °C, por 16 horas. Com o final da incubação, foram adicionados a cultura de bactérias crescidas em meio pré meio-mínio de cultura M9 (Anexo I) estando com densidade óptica (DO₆₀₀) inicial de 0,2. Em seguida, foi mantida sob agitação de 100 rpm a 37 °C até atingir a DO₆₀₀ = 0,8. Adiante, o meio de cultura foi centrifugado a 5000 xg, em 20 °C durante 20 minutos, após esse período, o pellet formado foi ressuspensionado em um litro de meio-mínimo de cultura M9 (Anexo I). Novamente, o meio foi mantido em agitação até atingir a DO₆₀₀ necessária e o meio de cultura foi induzido com 0,4 mM de IPTG, permanecendo incubada em 100 rpm overnight por 16 horas.

Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado a 3583 xg por 40 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensionadas em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM PMSF) e depois submetido à lise celular através de sonicação pulsada em 12 ciclos de 40 segundos cada (2 segundos ON e 1 segundo OFF, 40W). A amostra foi centrifugada a 34.957 xg a 4 °C com duração de 90 minutos. O sobrenadante foi filtrado em 0,45 µm Minisart®. Alíquotas de antes e após a indução foram coletadas para verificação da mesma em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

Utilizou-se o sistema de purificação manual com resina IMAC HiTrap HP previamente carregada com cloreto de cobalto, e equilibrada com tampão Tris-HCl (50 mM de Tris-HCl; 100 mM de NaCl, 5mM Imidazol e 1 mM de βMercaptoetanol, pH = 8,0). Em seguida, o lisado de células filtrados anteriormente foram aplicados à coluna e eluidos com aumento gradativo da concentração de Imidazol nas concentrações que variou de 20 mM a 1 M. Coletou-se amostras em cada aumento de concentração de Imidazol para posteriormente verificar a pureza em que se encontravam em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. A amostra foi concentrada com porções retirada da etapa de purificação por afinidade e, logo após, feita a purificação por exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 75 (GE Life Science®) para retirada de contaminantes e também pela troca da solução tampão da amostra. Foi utilizado

tampão Fosfato (20 mM fosfato de sódio, 100 mM NaCl e 1 mM de β -Mercaptoetanol em pH = 7,0). A pureza da amostra após a purificação por exclusão molecular foi verificada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 12%.

5.4.2 Formação da estrutura de DNA G-quadruplex

Neste ensaio foram adquiridos espectros recorrendo de duas sequências de oligonucleótidos: 14 nT - 5'-/GGGAGGGGGGAGGG-3'e sequência 18 nT 5'-/GGGAGGGAGGTGGGGGGG-3'. Estas sequências foram adquiridas em parceria com o Prof. Zamal Ahmed, do The University of Texas. As amostras de DNA foram preparadas com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,4, depois aquecido a 368 K por 10 minutos, seguido por arrefecimento lento até à temperatura ambiente durante 16 horas.

Para verificar a formação da estrutura G-quadruplex foi empregado o experimento de dicroísmo circular, sendo realizado num espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um controlador de temperatura *Peltier* CDF-426S e usando uma célula de 1 mm. Neste ensaio foram coletados espectros entre 240 e 350 nm, com uma acumulação de 10 varrimentos, a 298 K.

5.4.3 Espectroscopia de UV-visível para determinar as concentrações da proteína Grb2^{Y160F} e do DNA

Para a proteína Grb2^{Y160F}, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 36.565 cm⁻¹M⁻¹ em 280 nm. O espectro de absorção UV-Vis foi coletado em temperatura ambiente em um espectrofotômetro *Cary 3E spectrophotometer* (Varian, Palo Alto, CA) equipado com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. O espectro de absorção de UV-Vis foi registrado de 220 a 500 nm, fazendo-se a subtração da linha de base do tampão da solução analisada. O cálculo da concentração foi feito segundo a equação de Beer-Lambert.

Para o cálculo da concentração do DNA G-quadruplex, utilizou-se também o espectrofotômetro *Cary 3E spectrophotometer* (Varian, Palo Alto, CA) equipado com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e o espectro de absorção foi

registrado de 240 a 330 nm, foi utilizado o site AAT Bioquest para determinar as concentrações de DNA.

5.4.4 Espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro *ISS PC1 – Champaign II, USA* acoplado ao banho térmico *Nestlab RTE-221 – Thermo Electron Corporation, USA* em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, em temperaturas de 288, 298 e 308 K, para realizar a caracterização termodinâmica entre Grb2^{Y160F} e DNA G-quadruplex, tanto com a sequência de 18 nT e 14 nT, com abertura das fendas de emissão e excitação ajustadas em 1 nm. Os triptofanos da proteína Grb2^{Y160F} foram excitados em 295 nm com a faixa de emissão de 305 a 500 nm. A supressão de fluorescência foi feita com a concentração de Grb2^{Y160F} foi mantida constantemente a 5 µM, titulando-se concentração de DNA que variou de 1 a 10 µM.

5.5 Resultados e discussões

5.5.1 Parâmetros físico-químicos da proteína Grb2^{Y160F}

A proteína Grb2^{Y160F} possui cinco resíduo de triptofano, massa molecular de aproximadamente 25 kDa, ponto isoelétrico teórico (pI) de 5,89 e coeficiente de extinção molar de 36.565 cm⁻¹M⁻¹ (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos teóricos da proteína Grb2^{Y160F}. Resultados obtidos através da ferramenta online ProtParam.

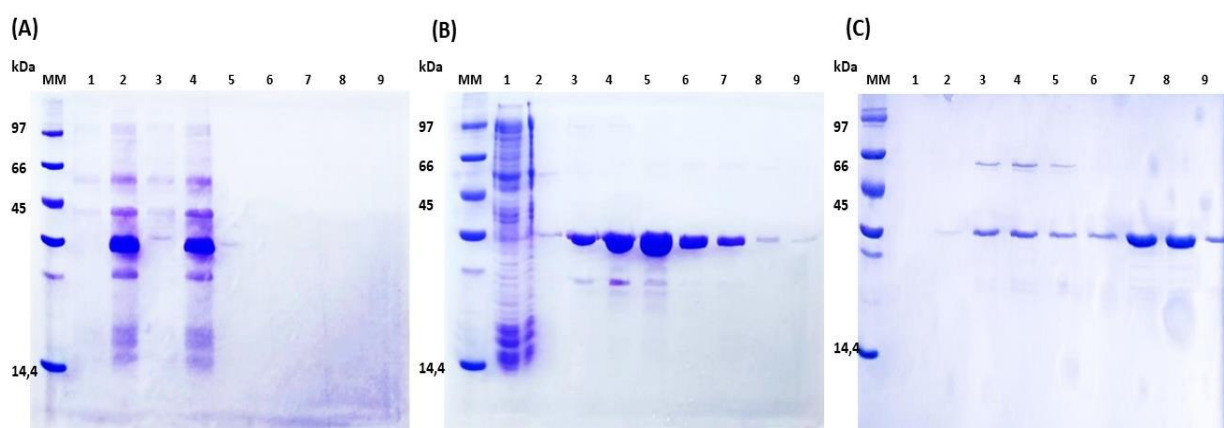
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	Domínio Grb2-SH2
Nº de resíduos de aminoácidos	217
Massa Molecular (kDa)	25,2 kDa
Ponto isoelétrico	5,89
Coeficiente de extinção molar em 280nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	36.565

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.5.2 Expressão e purificação da proteína Grb2^{Y160F}

A proteína Grb2^{Y160F} foi expressa, segundo o protocolo, descrito na seção 5.4.1 de materiais e métodos, e o resultado pode ser visto na Figura 5.4 - A. É possível observar a banda correspondente à proteína Grb2, um pouco acima de 25 kDa. Os resultados dos processos de purificação tanto por afinidade quanto por exclusão molecular podem ser visualizados através dos géis de acrilamida e do cromatograma (Figura 5.4 – B e C). As bandas de proteína nos géis mostram que a proteína foi purificada com um grau de pureza acima de 95%.

Figura 5.4: SDS-PAGE a 12% corado com Coomassie brilliant blue. (A) Antes (A.I) e depois (D.I) da indução da expressão da proteína Grb2^{Y160F} em *E.coli Gold* (DE3). (B) Gel de purificação por afinidade. (C) Gel de purificação por exclusão molecular.

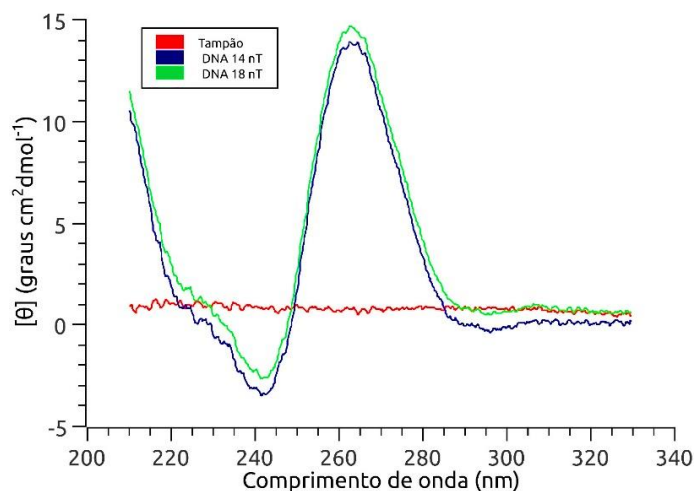


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.5.3 Avaliação da formação da estrutura do DNA G-quadruplex por dicroísmo circular

Antes de realizar o ensaio para investigar a interação entre a proteína e o DNA G-quadruplex, foi necessário confirmar a formação dessa estrutura nas sequências em estudo. Para tal, as sequências 14 e 18 nT foram preparadas em soluções descritas na seção 5.4.2, favorecendo a formação de G-quadruplex. Foram obtidos espectros de dicroísmo circular (CD) das sequências de modo a identificar a topologia dessas estruturas. Conforme representado na Figura 5.5, tanto o espectro da sequência 14 quanto da 18 nT apresentam uma banda de elipticidade positiva a 260 nm e uma banda negativa a 240 nm, características típicas de um G-quadruplex de topologia paralela [141].

Figura 5.5: Gráfico resultante da análise de dicroísmo circular com amostras do DNA G-quadruplex contendo tampão 100 mM fosfato de potássio pH 7,4.

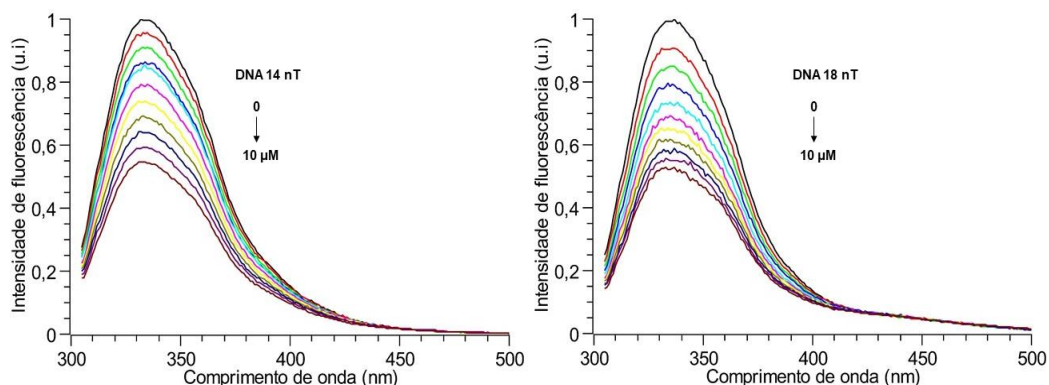


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.5.4 Determinação da interação entre a proteína Grb2^{Y160F} e o DNA G-quadruplex por espectroscopia de fluorescência

A análise dos resultados de supressão de fluorescência, conforme evidenciado na Figura 5.6, indica que há interação entre Grb2^{Y160F} e ambas as sequências de DNA G-quadruplex. Observa-se uma redução na intensidade de fluorescência à medida que a concentração do DNA aumenta. Esta redução na intensidade de fluorescência da proteína, em decorrência do aumento na concentração do DNA no microambiente proteico adjacente aos resíduos de triptofano, sugere interação em regiões específicas que abrigam esses resíduos.

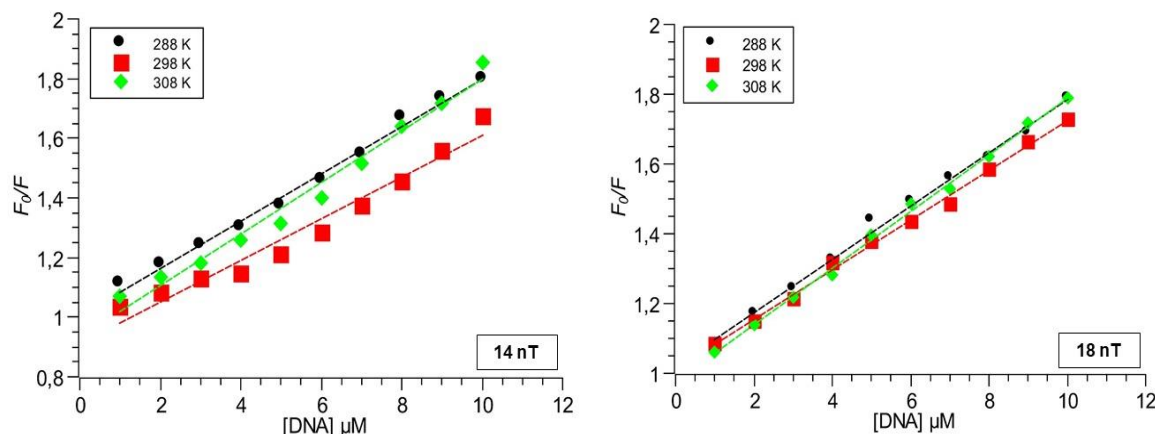
Figura 5.6: Análise do espectro de fluorescência da proteína Grb2^{Y160F} com DNA G-quadruplex de 14 e 18 nT. A varredura da emissão de fluorescência da proteína foi feita entre 305 e 500 nm, com comprimento de excitação de 295 nm, e com a adição de concentrações crescentes dos DNAs.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A fim de compreender o mecanismo subjacente a essa supressão, a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi determinada por meio da regressão linear dos dados, como apresentado no gráfico da Figura 5.7.

Figura 5.7 - Gráfico de Stern-Volmer para a interação Grb2^{Y160F} com os DNAs 14 e 18 nT. A relação entre a fluorescência da proteína na ausência e na presença dos ligantes.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os valores do K_{sv} , resumidos na Tabela 5.2 para cada uma das temperaturas investigadas (288, 298 e 308 K), indicam que esta constante é proporcional ao aumento da temperatura, tanto para o DNA 14 quanto para o 18 nT. Sugerindo que o mecanismo de supressão é do tipo dinâmico.

Tabela 5.2: Valores obtidos para a constante de Stern Volmer (K_{sv}). O aumento proporcional em relação à temperatura indica que a supressão de fluorescência ocorre através do mecanismo dinâmico.

Grb2-DNA 14 nT		Grb2-DNA 18 nT	
T (K)	$K_{sv} (x 10^5 M^{-1})$	T (K)	$K_{sv} (x 10^5 M^{-1})$
288	7,9±0,2	288	7,6±0,1
298	6,9±0,2	298	7,1±0,1
308	8,6±0,3	308	8,1±0,1

R = 0,788 (coeficiente de correlação)

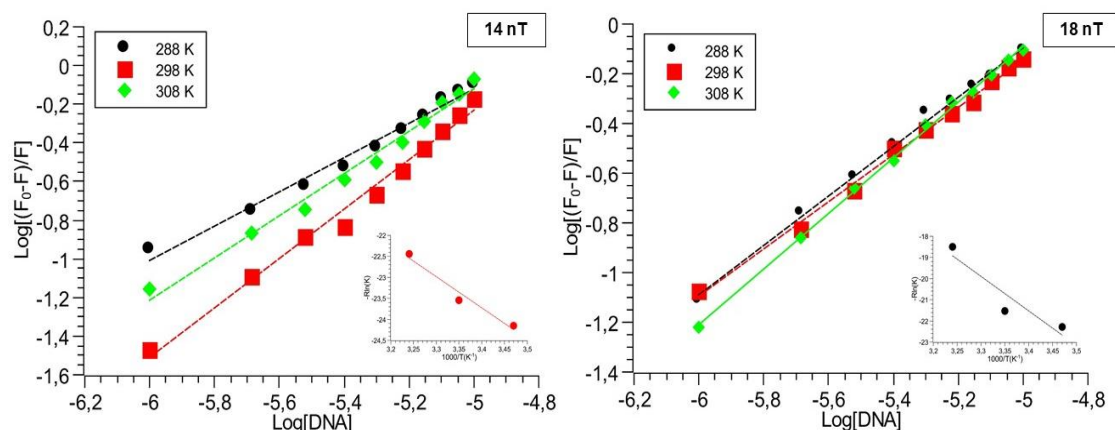
R = 0,820 (coeficiente de correlação)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir dos dados de supressão da fluorescência, torna-se possível estimar as constantes de ligação K_b e o número de sítios de ligação (n) utilizando a equação do duplo-log. A Figura 5.8 mostra os gráficos para a proteína e as amostras de DNA de

14 e 18 nT em diferentes temperaturas (288, 298 e 308 K), ajustados por essa equação.

Figura 5.8: Gráfico de duplo-log para a supressão de fluorescência da Grb^{Y160F} pelo DNA. Nos insertos de cada gráfico de duplo-log está o gráfico de van't Hoff.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Ao analisar a Tabela 5.3, observa-se que, para ambas as sequências de DNA, o número de sítios de ligação é de aproximadamente 1 ligante/proteína e apresentam uma interação que é definida como moderada, sendo o DNA 14 nT de ordem 10^5 e o DNA 18 nT de ordem 10^4 .

Tabela 5.3: Valores das constantes de ligação (k_b) e número de sítios de ligação (n).

Grb2-DNA 14 nT			Grb2-DNA 18 nT		
T (K)	K_b ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	n	T (K)	K_b ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}$)	n
288	$1,9 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	288	$7,4 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
298	$1,4 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	298	$5,4 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
308	$1,0 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	308	$1,1 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

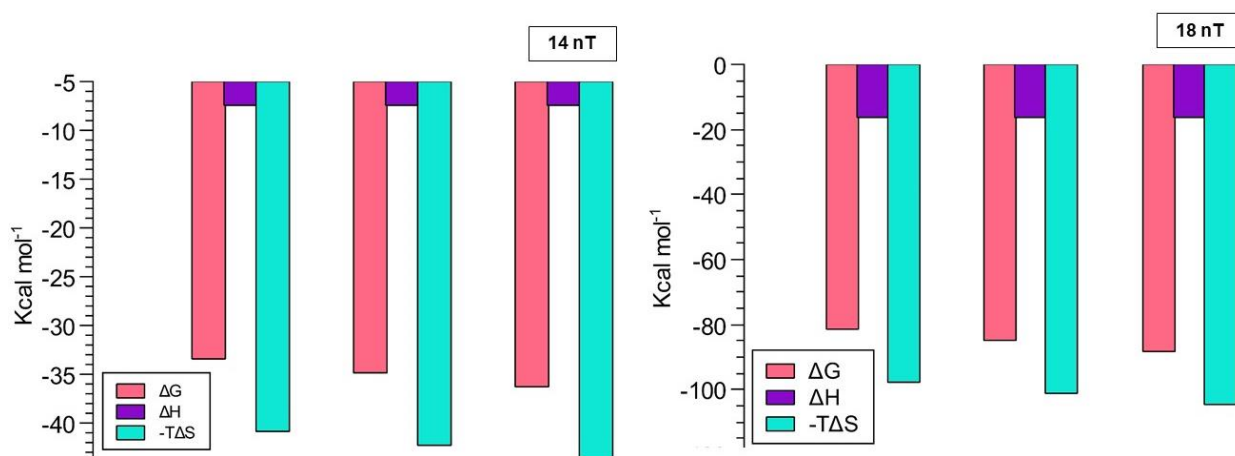
Ademais, a análise da relação de van't Hoff (Figura 5.9, Tabela 5.4) permitiu calcular os parâmetros termodinâmicos, revelando que a interação em ambos os sistemas é espontânea e segue uma direção entropicamente favorável. O valor negativo obtido para a entalpia ($\Delta H < 0$), associado a um $\Delta G < 0$ e $-T\Delta S < 0$, sugere que a interação é exotérmica, entropicamente favorecida e espontânea. Essas características são típicas de ligações fracas e interações não covalentes, como as forças de van der Waals.

Tabela 5.4: Valores das variações da energia livre de Gibbs ΔG , de entalpia ΔH e entropia ΔS .

DNA	Temperatura (K)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
14 nT	288	$-33,4 \pm 1,4$		$-40,8 \pm 0,9$
	298	$-34,8 \pm 0,8$	$-7,3 \pm 1,2$	$-42,2 \pm 0,8$
	308	$-36,2 \pm 0,6$		$-43,6 \pm 0,9$
18 nT	288	$-81,3 \pm 2,8$		$-97,6 \pm 5,2$
	298	$-84,7 \pm 3,2$	$-16,3 \pm 2,9$	$-101,0 \pm 4,9$
	308	$-88,1 \pm 3,6$		$-104,4 \pm 5,6$

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 5.9: Perfil termodinâmico da Grb^{Y160F} com os DNAs. Em rosa tem-se representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em roxo a variação de entalpia (ΔH) e em azul a variação de entropia ($-T\Delta S$).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Esses resultados indicados pela técnica de espectroscopia de fluorescência mostram que a sequência de 14 nT possui características estruturais ou composicionais que permitem uma interação mais eficaz com a proteína Grb2^{Y160F} em comparação com a outra sequência. Essa diferença na interação pode ter implicações significativas na compreensão da função dessas sequências de DNA no contexto biológico ou na concepção de terapias e intervenções baseadas nessa interação proteína-DNA.

5.6 Conclusão

A presença da proteína Grb2 no núcleo levanta a possibilidade de sua influência na estabilização ou inibição na formação estruturas secundárias de DNA, como o G-quadruplex, assim como outras proteínas associadas à via de reparo por homologia. Isso poderia contribuir significativamente para o reparo eficiente dos danos ao DNA, ainda que careça de evidências experimentais para validação. Em busca desse entendimento, investigamos a interação da forma monomérica da proteína Grb2 com essas estruturas de DNA, utilizando espectroscopia de fluorescência.

Os experimentos revelaram que a Grb2^{Y160F} se liga às sequências de DNA G-quadruplex (14 e 18 nT) por meio da supressão dinâmica, evidenciando uma K_{sv} da ordem de 10^5 M^{-1} . Observou-se que a supressão não é completa na presença desses DNAs, sugerindo uma ligação em um domínio específico, suprimindo os sinais de fluorescência dos triptofanos nessa região, enquanto outros triptofanos permanecem livres para fluorescer.

A análise resultou que nos dois sistemas, temos o número de sítios de ligação na proporção de 1:1 (ligante/proteína). A constante de associação é de ordem de 10^5 M^{-1} para o complexo Grb2^{Y160F} com o DNA 14 nT e de 10^4 M^{-1} para o DNA 18 nT, indicando uma afinidade moderada.

Os valores de energia livre de Gibbs foram negativos ($\Delta G < 0$), sugerindo que a interação é exotérmica, entropicamente favorecida e espontânea, características típicas de interações não covalentes, como as forças de van der Waals. Esses dados enfatizam a relevância de compreender as interações proteína-DNA, uma vez que podem ter implicações fundamentais no reparo do DNA e na manutenção da estabilidade genômica, oferecendo novas abordagens para potenciais estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- [1] SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- [2] WILD, C.P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B.W.; (ed.). **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020.
- [3] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 15 set 2023.
- [4] BUNZ, F. **Principles of Cancer Genetics**. 2. ed New York: Springer Science & Business Media, 2016.
- [5] BABA, A.I.; CĂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; 2007. Chapter 3, Tumor Cell Morphology.
- [6] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- [7] PERSI, E. *et al.* Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 31 jul. 2018.
- [8] SWIETACH, P. *et al.* The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1638, 2014.
- [9] MARTIN, T. A. *et al.* **Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>>. Acesso em: 15 set. 2023.
- [10] VIDAL, M.; GIGOUX, V.; GARBAY, C. SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 40, n. 2, p. 175–186, 2001.

- [11] SCHLESSINGER, J. SH2/SH3 signaling proteins. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, n. 1, p. 25–30, 1994.
- [12] SASTRY, L.; CAO, T.; C. RICHTER KING. Multiple Grb2-protein complexes in human cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 70, n. 2, p. 208–213, 1997.
- [13] FLYNN, D. C. Adaptor proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 44, p. 6270–6272, 2001.
- [14] TARI, A. GRB2: A pivotal protein in signal transduction. **Seminars in Oncology**, v. 28, p. 142–147, 2001.
- [15] LOWENSTEIN, E. *et al.* The SH2 and SH3 Domain-Containing Protein GRB2 Links Receptor Tyrosine Kinases to ras Signaling. **Cell**, v. 70, p. 431–442, 1992.
- [16] MUSACCHIO, A.; WILMANN, M.; SARASTER, M. Structure and function of the SH3 domain. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 61, n. 3, p. 283–297, 1994.
- [17] KUROCHKINA, N.; GUHA, U. SH3 domains: modules of protein–protein interactions. **Biophysical Reviews**, v. 5, n. 1, p. 29–39, 2012.
- [18] KANEKO, T. The SH3 domain- a family of versatile peptide- and protein-recognition module. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 4938-4952, 2008.
- [19] MARENGERE, L. E. M.; PAWSON, T. Structure and function of SH2 domains. **Journal of Cell Science**, v. 1994, n. Supplement 18, p. 97–104, 1994.
- [20] ROZAKIS-ADCOCK, M. *et al.* The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. **Nature**, v. 363, n. 6424, p. 83–85, 1993.
- [21] STAINTHORP, A. *et al.* Regulation of microRNA expression by the adaptor protein GRB2. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 2023.
- [22] YE, Z. *et al.* GRB2 enforces homology-directed repair initiation by MRE11. **Science Advances**, v. 7, n. 32, 2021.
- [23] LIN, C.-C. *et al.* Inhibition of Basal FGF Receptor Signaling by Dimeric Grb2. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1514–1524, 2012.
- [24] AHMED, Z. *et al.* Grb2 monomer–dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7354, 24 jun. 2015.

- [25] ALBERTS, B. *et al.* *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- [26] BELOV, A. A.; MOHAMMADI, M. Grb2, a Double-Edged Sword of Receptor Tyrosine Kinase Signaling. **Science Signaling**, v. 5, n. 249, 2012.
- [27] PLOTNIKOV, A. *et al.* The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, set. 2011.
- [28] AHMED, Z. *et al.* Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 493–504, 2013.
- [29] QU, C. K. The SHP-2 tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions. **Cell Research**, v. 10, n. 4, p. 279–288, 2000.
- [30] SANCAR, A. *et al.* Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39–85, jun. 2004.
- [31] STRACKER, T. H.; PETRINI, J. H. J. The MRE11 complex: starting from the ends. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 90–103, 2011.
- [32] XIAO, A. *et al.* WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 57–62, 2008.
- [33] PAULL, T. T. *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. **Current Biology**, v. 10, n. 15, p. 886–895, 2000.
- [34] WU, L. *et al.* MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11200–11205, 2008.
- [35] MELANDER, F. *et al.* Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage–modified chromatin. v. 181, n. 2, p. 213–226, 2008.
- [36] CHRISTOPH SPYCHER *et al.* Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11–RAD50–NBS1 complex to damaged chromatin. v. 181, n. 2, p. 227–240, 2008.

- [37] CHAPMAN, J. R.; JACKSON, S. P. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. **EMBO reports**, v. 9, n. 8, p. 795–801, 2008.
- [38] MARNETT, L. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 214–221, 2001.
- [39] LOPES, J. *et al.* G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 19, p. 4033–4046, 2011.
- [40] LINKE, R. *et al.* The Relevance of G-Quadruplexes for DNA Repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12599, 22 nov. 2021.
- [41] SPINK, C. H. Differential Scanning Calorimetry. **Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques**, p. 115–141, 2008.
- [42] STURTEVANT, J. M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 6, p. 2236–2240, 1977.
- [43] SANCHEZ-RUIZ, J. M. *et al.* Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1648–1652, 1988.
- [44] SPINK, C. H. The deconvolution of differential scanning calorimetry unfolding transitions. **Methods**, v. 76, p. 78–86, 2015.
- [45] MILES, A. J.; JANES, R. W.; WALLACE, B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 15, p. 8400–8413, 2021.
- [46] GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.
- [47] WALLACE, B. The role of circular dichroism spectroscopy in the era of integrative structural biology. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 58, p. 191–196, 2019.
- [48] SREERAMA, N. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. **Protein Science**, v. 13, n. 1, p. 100–112, 2004.
- [49] LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer Science+Business Media, 2010.

- [50] VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- [51] ALBANIJ. R. **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, 2008.
- [52] PFEFER, T. J.; MATCHETTE, L. S.; DREZEK, R. Influence of illumination-collection geometry on fluorescence spectroscopy in multilayer tissue. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 42, n. 5, p. 669–673, 2004.
- [53] CHEN, S.; YU, Y.-L.; WANG, J.-H. Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 999, p. 13–26, 2018.
- [54] BAKAR, K. A.; FERROZ, S. R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 223, p. 117337, 2019.
- [55] KUMAR PANIGRAHI, S.; KUMAR MISHRA, A. Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 41, p. 100318, 2019.
- [56] VAN DE WEERT, M.; STELLA, L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. **Journal of Molecular Structure**, v. 998, n. 1-3, p. 144–150, 2011.
- [57] GIUBELLINO, A.; BURKE, T. R.; BOTTARO, D. P. Grb2 signaling in cell motility and cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 12, n. 8, p. 1021–1033, 2008.
- [58] SANCHES, K. *et al.* Grb2 dimer interacts with Coumarin through SH2 domains: A combined experimental and molecular modeling study. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02869, 2019.
- [59] SANCHES, K. *et al.* Thermodynamic profile and molecular modeling of the interaction between Grb2 dimer and flavonoids Rutin and Morin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1234, p. 130164, 2021.
- [60] GAY, B. *et al.* Selective GRB2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. **International Journal of Cancer**, v. 83, n. 2, p. 235–241, 1999.

- [61] MACHIDA, K.; MAYER, B. J. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 1, p. 1–25, 2005.
- [62] LUNG, F.D.T.; TSAI, J.Y. Grb2 SH2 domain-binding peptide analogs as potential anticancer agents. **Biopolymers**, v. 71, n. 2, p. 132–140, 2003.
- [63] SHAKESPEARE, W. C. SH2 domain inhibition: a problem solved? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 409–415, 2001.
- [64] SADOWSKI, I.; STONE, J. C.; PAWSON, T. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 12, p. 4396–4408, 1986.
- [65] PAWSON, T. Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. **Oncogene**, v. 3, n. 5, p. 491–495, 1988.
- [66] KRASKOUSKAYA, D. *et al.* Progress towards the development of SH2 domain inhibitors. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3337–3370, 2013.
- [67] LIU, B. A. *et al.* The Human and Mouse Complement of SH2 Domain Proteins—Establishing the Boundaries of Phosphotyrosine Signaling. **Molecular Cell**, v. 22, n. 6, p. 851–868, 2006.
- [68] PAWSON, T.; GISH, G. D.; NASH, P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 504–511, 2001.
- [69] MORAN, M. F. *et al.* Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8622–8626, 1990.
- [70] ZHOU, S. *et al.* SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. **Cell**, v. 72, n. 5, p. 767–778, 1993.
- [71] IJAZ, M. *et al.* The Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 12, 2018.
- [72] LIU, B. A.; ENGELMANN, B. W.; NASH, P. D. The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. **FEBS Letters**, v. 586, n. 17, p. 2597–2605, 2012.

- [73] MARENGERE, L. E. M. *et al.* SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. **Nature**, v. 369, n. 6480, p. 502–505, 1994.
- [74] SANCHES, K. *et al.* The dynamics of free and phosphopeptide-bound Grb2-SH2 reveals two dynamically independent subdomains and an encounter complex with fuzzy interactions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13040, 2020.
- [75] LOWENSTEIN, E. J. *et al.* The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 431–442, 1992.
- [76] SINGH TULI, H. *et al.* Ferulic Acid: A Natural Phenol That Inhibits Neoplastic Events through Modulation of Oncogenic Signaling. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 21, p. 7653, 2022.
- [77] HASAN, G. M. *et al.* Therapeutic Targeting of Regulated Signaling Pathways of Non-Small Cell Lung Carcinoma. **ACS omega**, v. 8, n. 30, p. 26685–26698, 2023.
- [78] MOHAMED ABDOUL-LATIF, F. *et al.* Exploring the Potent Anticancer Activity of Essential Oils and Their Bioactive Compounds: Mechanisms and Prospects for Future Cancer Therapy. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 8, p. 1086, 2023.
- [79] BARBHARA MOTA MARINHO; CAROLINE HONAISER LESCO; SANTOS. Brazilian arnicas: bioactive compounds, pharmacological properties, potential use and clinical applications. **Phytochemistry Reviews**, 2023.
- [80] IWEALA, E. J. *et al.* Bioactive Phytoconstituents and Their Therapeutic Potentials in the Treatment of Haematological Cancers: A Review. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 7, p. 1422, 2023.
- [81] NKWE, D. O. *et al.* Anticancer Mechanisms of Bioactive Compounds from Solanaceae: An Update. **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4989, 2021.
- [82] MARTÍN ORTEGA, A. M.; SEGURA CAMPOS, M. R. Bioactive Compounds as Therapeutic Alternatives. **Bioactive Compounds**, p. 247–264, 2019.
- [83] SRINIVASAN, K. Antimutagenic and cancer preventive potential of culinary spices and their bioactive compounds. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 3, p. 89–102, 2017.
- [84] SENTHILKUMAR, K. *et al.* Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 366–374, 2013.

- [85] WU, M.-S. *et al.* Anti-Inflammatory and Anticancer Properties of Bioactive Compounds from *Sesamum indicum* L.—A Review. **Molecules**, v. 24, n. 24, 2019.
- [86] JAIN, P.; JOSHI, H. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Scienc*, v.2, n.6, p. 236-240, 2012.
- [87] LACY, A. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3797–3811, 2004.
- [88] THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 476–495, 2015.
- [89] MOHLER, J. L. *et al.* Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120 Suppl, p. S35-38, 1994.
- [90] LOPEZ-GONZALEZ, J. S. *et al.* Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 43, n. 3, p. 275–283, 2004.
- [91] MAUCHER, A.; VON ANGERER, E. Antitumour activity of coumarin and 7-hydroxycoumarin against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinomas. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, n. 8, p. 502–504, 1994.
- [92] MUSA, M.; COOPERWOOD, J.; KHAN, M. O. A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 26, p. 2664–2679, 2008.
- [93] PATIL, J. R. *et al.* 5-Geranyloxy-7-methoxycoumarin inhibits colon cancer (SW480) cells growth by inducing apoptosis. **Planta Medica**, v. 79, n. 3-4, p. 219–226, 2013.
- [94] SINGH, R. K. *et al.* A coumarin derivative (RKS262) inhibits cell-cycle progression, causes pro-apoptotic signaling and cytotoxicity in ovarian cancer cells. **Investigational New Drugs**, v. 29, n. 1, p. 63–72, 2009.
- [95] VENU GOPAL, J. Morin Hydrate: Botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 3, p. 123–126, 2013.

- [96] THAKUR, K. *et al.* Morin as an imminent functional food ingredient: an update on its enhanced efficacy in the treatment and prevention of metabolic syndromes. **Food & Function**, v. 11, n. 10, p. 8424–8443, 2020.
- [97] YONG, H. J.; AHN, J. J. Antioxidant and skin protection effect of morin upon UVA exposure. **Biomedical Dermatology**, v. 2, n. 1, 2018.
- [98] KHAMCHAI, S. *et al.* Morin protects the blood–brain barrier integrity against cerebral ischemia reperfusion through anti-inflammatory actions in rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- [99] LEE, Y. J. *et al.* Flavonoid morin inhibits proliferation and induces apoptosis of melanoma cells by regulating reactive oxygen species, Sp1 and Mcl-1. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 6, p. 531–542, 2019.
- [100] AMIN, M. U. *et al.* Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 59, 2015.
- [101] MOTTAGHI, S.; ABBASZADEH, H. The anticarcinogenic and anticancer effects of the dietary flavonoid, morin: Current status, challenges, and future perspectives. **Phytotherapy Research**, 2021.
- [102] VISHNUKUMAR, S.; STEPHAN, R.; CHANDRA, S. Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of morin on lipids and lipoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, p. 577–585, 2012.
- [103] AL NUMAIR, K. S. *et al.* Protective effect of morin on cardiac mitochondrial function during isoproterenol-induced myocardial infarction in male Wistar rats. **Redox Report**, v. 17, n. 1, p. 14–21, 2012.
- [104] KUZU, M. *et al.* Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 89–100, 2019.
- [105] MERWID-LAD, A. *et al.* The Impact of Morin, a Natural Flavonoid, on Cyclophosphamide-Induced Changes in the Oxidative Stress Parameters in Rat Livers. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 4, p. 505–509, 2014.

- [106] XU, M.; ZHANG, Y. Morin Inhibits Ovarian Cancer Growth through the Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 2243–2250, 2020.
- [107] SHIN, S.-S. *et al.* Morin Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Bladder Cancer EJ Cells via Modulation of Signaling Pathways, Cell Cycle Regulators, and Transcription Factor-Mediated MMP-9 Expression. **Drug Development Research**, v. 78, n. 2, p. 81–90, 2017.
- [108] LEE, Y. J. *et al.* Flavonoid morin inhibits proliferation and induces apoptosis of melanoma cells by regulating reactive oxygen species, Sp1 and Mcl-1. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 6, p. 531–542, 2019.
- [109] JUNG, H.-J. *et al.* Evaluation of the Antiangiogenic, Anti-inflammatory, and Antinociceptive Activities of Morin. **Planta Medica**, v. 76, n. 03, p. 273–275, 2009.
- [110] BROWN, J. Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 2, p. 171–177, 2003.
- [111] SINGH *et al.* Morin Hydrate Reverses Cisplatin Resistance by Impairing PARP1/HMGB1-Dependent Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 986, 2019.
- [112] SANCHES, K. Dinâmica estrutural da proteína adaptadora Grb2, seu domínio SH2 e a interação com cumarina por ressonância magnética nuclear e fluorescência. 2019.
- [113] SHOBINI, J. *et al.* Interaction of coumarin derivatives with human serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopic technique and modeling studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, n. 5, p. 1133–1147, 2001.
- [114] Silva, P.H. Estudos da Interação da Proteína Adaptadora Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) com os Flavonoides Morina e Rutina. 2017.
- [115] MICSONAI, A. *et al.* BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2018.

- [116] BOUWMAN, P.; JONKERS, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 9, p. 587–598, 2012.
- [117] CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 2010.
- [118] HERSHMAN, S. *et al.* Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 1, p. 144–156, 2008.
- [119] LI, X.; HEYER, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 99–113, 2008.
- [120] RANJHA, L.; HOWARD, S. M.; CEJKA, P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 187–214, 2018.
- [121] KOWALCZYKOWSKI, S. C. An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 11, p. a016410, 2015.
- [122] D'AMOURS, D.; JACKSON, S. P. The MRE11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 317–327, 2002.
- [123] RUFF, P. *et al.* RPA Stabilization of Single-Stranded DNA Is Critical for Break-Induced Replication. **Cell Reports**, v. 17, n. 12, p. 3359–3368, 2016.
- [124] LIU, J. *et al.* Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 10, p. 1260–1262, 2010.
- [125] HINDGES, R.; HÜBSCHER, U. DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 5, 1997.
- [126] SPIEGEL, J.; ADHIKARI, S.; BALASUBRAMANIAN, S. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes. **Trends in Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 123–136, 2020.

- [127] MA, X.; TANG, T.-S.; GUO, C. Regulation of translesion DNA synthesis in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 61, n. 7, p. 680–692, 2020.
- [128] HAKEM, R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 4, p. 589–605, 2008.
- [129] MARNETT, L. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends in Genetics**, v.17, n. 4, p. 214–221, 2001.
- [130] BALASUBRAMANIAN, S.; NEIDLE, S. G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 345–353, 2009.
- [131] NAKANISHI, C.; SEIMIYA, H. G-quadruplex in cancer biology and drug discovery. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 531, n. 1, p. 45–50, 2020.
- [132] HUPPERT, J. L. Prevalence of quadruplex in the human genome. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2908–2916, 2005.
- [133] CHEN, L. *et al.* DNA G-Quadruplex in Human Telomeres and Oncogene Promoters: Structures, Functions, and Small Molecule Targeting. **Accounts of Chemical Research**, v. 55, n. 18, p. 2628–2646, 2022.
- [134] HERSHMAN, S. *et al.* Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 1, p. 144–156, 2008.
- [135] RHODES, D.; LIPPS, H. J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 18, p. 8627–8637, 2015.
- [136] BOCHMAN, M. L.; PAESCHKE, K.; ZAKIAN, V. A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 11, p. 770–780, 2012.
- [137] PAVLOVA, A. V. *et al.* Impact of G-Quadruplexes on the Regulation of Genome Integrity, DNA Damage and Repair. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1284, 2021.

- [138] LEE, W. T. C. *et al.* Single-molecule imaging reveals replication fork coupled formation of G-quadruplex structures hinders local replication stress signaling. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.
- [139] LIU, S. *et al.* DNA repair protein RAD52 is required for protecting G-quadruplexes in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 1, p. 102770, 2023.
- [140] YANG, D. G-Quadruplex DNA and RNA. **Methods in Molecular Biology**, p. 1–24, 2019.
- [141] KEJNOVSKÁ, I. *et al.* CD Study of the G-Quadruplex Conformation. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2035, p. 25–44, 2019.

ANEXO I – MEIO MÍNIMO M9

Meio mínimo M9 – 200 ml	
H ₂ O Milli-Q®	50 ml
CaCl ₂ (1 M)	20 µl
TS2 (0.2 V%)	400 µl
Fe III (10 mM)	200 µl
Ampicilina (50 mg/ml)	200 µl
Coquetel de Vitaminas	200 µl
B2	200 µl
B1	200 µl
MgSO ₄ (1 M)	400 µl
Glicose (20%)	5 ml
NH ₄ Cl	0.2 g
Completar até 200 ml com H ₂ O Milli-Q®	
Meio mínimo M9 – 1000 ml	
H ₂ O Milli-Q ®	200 ml
CaCl ₂ (1 M)	100 µl
TS2 (0.2 V%)	2 ml
Fe III (10 mM)	1 ml
Ampicilina (50 mg/ml)	1 ml
Coquetel de Vitaminas	1 ml
B2	1 ml
B1	1 ml
MgSO ₄ (1 M)	2 ml
Glicose (20%)	50 ml
NH ₄ Cl	1 g
M9 (5x)	200 ml
Completar até 1000 ml com H ₂ O Milli-Q ®	