

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/12/2025.



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

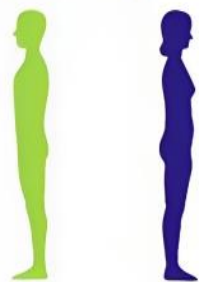
1 INTRODUÇÃO

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.

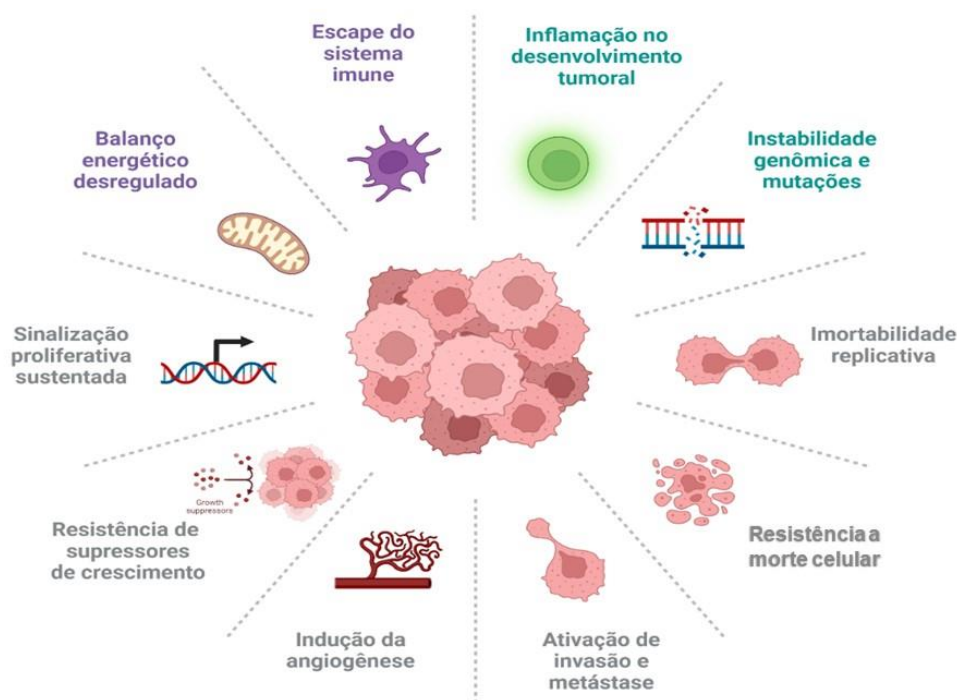
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	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].

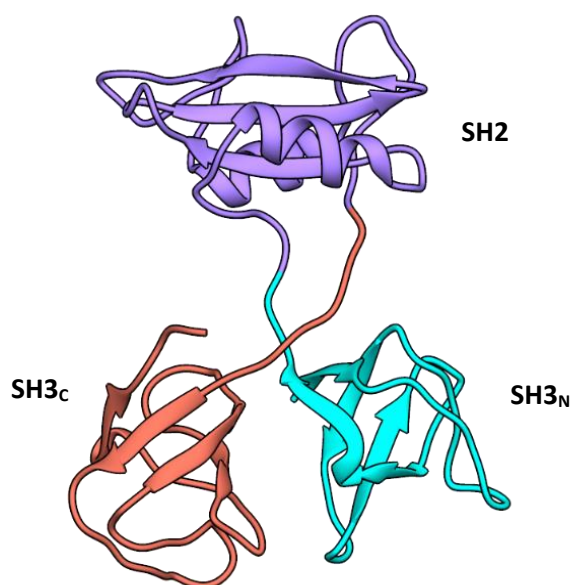
Sabe-se que proteínas contendo o domínio SH2 e/ou SH3 desempenham papéis essenciais em diversas vias de sinalização bem caracterizadas, incluindo a via da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), a qual está envolvida no crescimento, proliferação e diferenciação celular [10,11]. Este é o caso da 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.

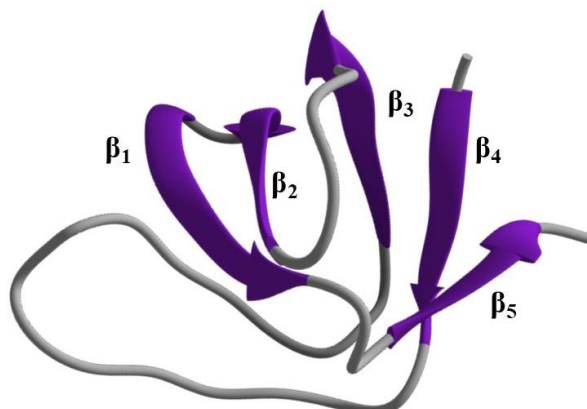


Fonte: adaptado do PDB: id 1GRI.

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].

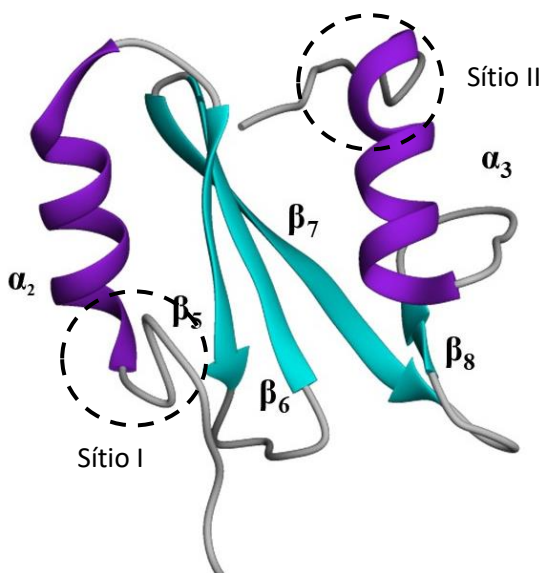
Figura 1.4: Estrutura do domínio SH3c da proteína Grb2. Esse domínio é formado por cinco folhas- β , das quais três paralelas e duas antiparalelas.



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].

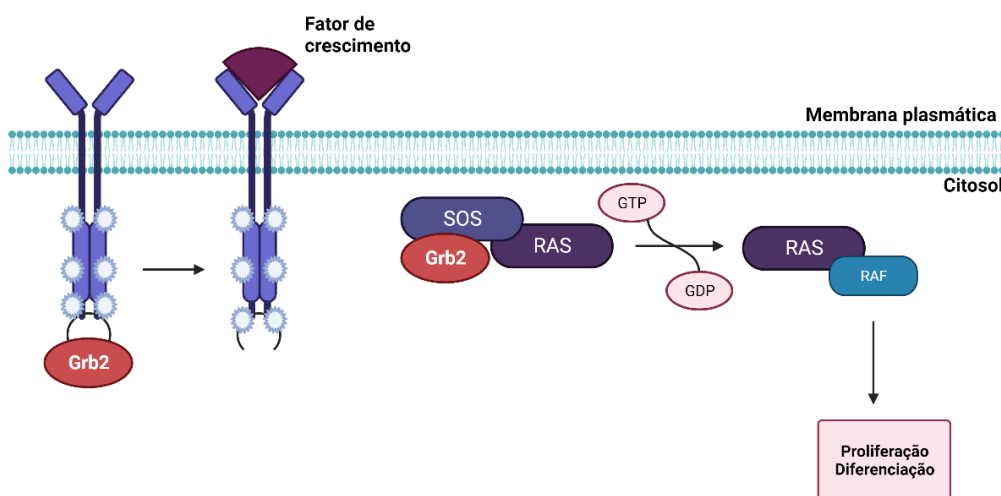
A Grb2 é conhecida por sua interação com o receptor de fator de crescimento de fibroblasto humano (FGFR). Foi observado que essa interação entre a proteína Grb2 e a proteína FGFR2 pode ocorrer mesmo na ausência de estímulos extracelulares [23]. Nessa circunstância, a FGFR2 autofosforila-se antes de qualquer 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].

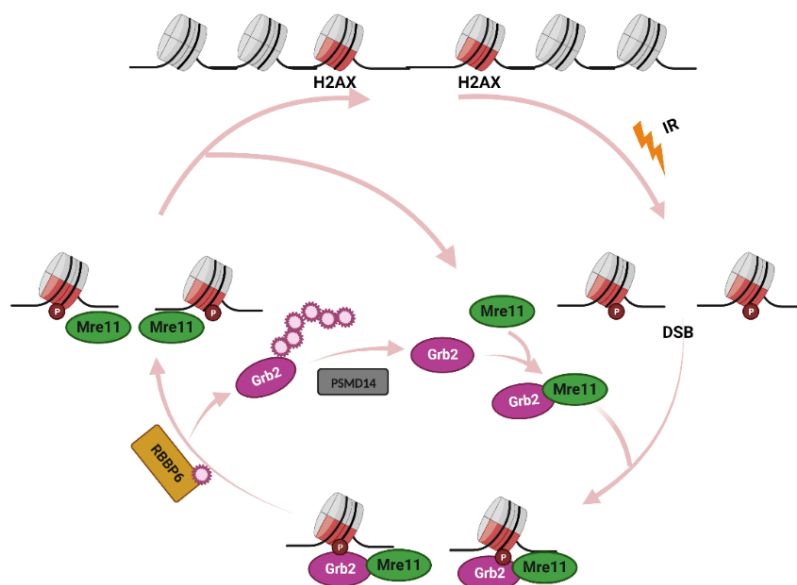
Estudos revelam que a Grb2 forma inesperadamente um complexo Grb2-Mre11 (GM), validado biofisicamente para uma iniciação eficiente da HR [22]. A Mre11, componente do complexo MRE junto com Rad 50 e Nbs1, desempenha um papel importante na via de reparo de DNA, evitando o acúmulo de quebras e rearranjos 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].

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.; CÂTOI, 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 HONAISSER LESCANO; 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.; JAIRAK, 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 ®	