

Artigo

Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores

Barra, C. V.; Netto, A. V. G.

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (6), 1998-2016. Data de publicação na Web: 25 de agosto de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalintercalators**

Abstract: DNA is considered to be one of the major targets of anticancer drugs. Cisplatin and its analogues exert their activity by forming covalent bonds with the DNA base pairs. However, the DNA structure enables its interaction with metal complexes in many different modes and intercalation is often observed. Particularly, metalintercalators stand out as a class of potential antitumour agents that could circumvent problems such cellular resistance since their mechanism of action is different from that of cisplatin. The interaction complex-DNA can be studied by various techniques, including reaction with guanosine, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), viscosity measurements, spectrophotometric titration for determination of K_b , DNA thermal denaturation and fluorescence spectroscopy.

Keywords: Antitumour complexes; DNA interaction; metalintercalators.

Resumo

O DNA é apontado como um dos principais alvos dos compostos antineoplásicos. A cisplatina e seus análogos manifestam sua atividade através de ligações covalentes às bases nitrogenadas do DNA. No entanto, a riqueza estrutural do DNA possibilita sua interação com complexos metálicos de diversas maneiras, sendo a intercalação frequentemente observada. Os metalintercaladores constituem uma classe de potenciais agentes antitumorais e o fato de possuírem mecanismo de ação diferente da cisplatina faz com que sejam fortes candidatos a contornarem problemas como a resistência celular. O tipo de interação complexo-DNA pode ser estudado através de diversas técnicas, entre elas reação com a guanossina, ensaio de mudança da mobilidade eletroforética do DNA (EMSA), medidas de viscosidade, titulação espectrofotométrica para determinação de K_b , desnaturação térmica do DNA e espectroscopia de fluorescência.

Palavras-chave: Complexos antitumorais; interação com DNA; metalintercaladores.

* Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Geral e Inorgânica, CEP 14800-060, Araraquara-SP, Brasil.

✉ carolvbr@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20150118](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118)

Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores

Carolina Valério Barra,* Adelino V. G. Netto

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Geral e Inorgânica, CEP 14800-060, Araraquara-SP, Brasil.

* carolvbr@gmail.com

Recebido em 15 de outubro de 2014. Aceito para publicação em 24 de agosto de 2015

1. Introdução
2. O DNA como alvo no tratamento de neoplasias
 - 2.1. Interações entre complexos metálicos e o DNA
3. Metalintercaladores
 - 3.1. Breve histórico
 - 3.2. Características da intercalação
 - 3.3. Bis-intercaladores
 - 3.4. Intercaladores sinérgicos
4. Técnicas utilizadas no estudo da interação complexo-DNA
 - 4.1. Reação com a guanosina
 - 4.2. Ensaio de mudança da mobilidade eletroforética do DNA (EMSA)
 - 4.3. Viscosidade
 - 4.4. Titulação espectrofotométrica para determinação de K_b
 - 4.5. Desnaturação térmica do DNA
 - 4.6. Espectroscopia de fluorescência
5. Considerações Finais

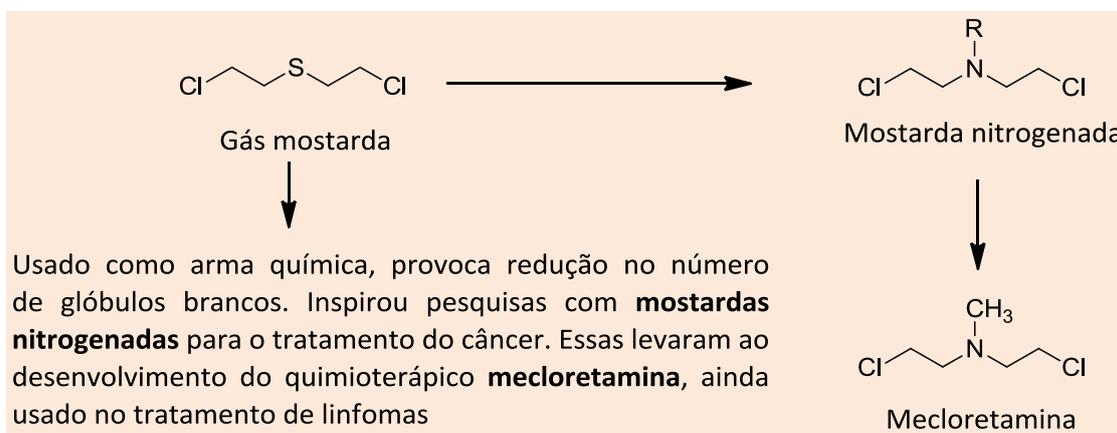
1. Introdução

A primeira demonstração de que compostos químicos poderiam ser utilizados no tratamento do câncer aconteceu em 1942, quando Goodman e Gilman mostraram a redução do tumor de um paciente com linfoma, ao ser tratado com uma mostarda nitrogenada, a mecloretamina¹ (Esquema 1).

A ideia da cura do câncer surgiu cerca de 20 anos depois, ao ser demonstrada a cura da leucemia em camundongos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida.² Desde então, muitos quimioterápicos foram aprovados para comercialização para o tratamento do câncer, mas a busca do fármaco ideal permanece até os dias de hoje. Apesar dos grandes avanços nessa área, muitos estudos ainda deverão ser realizados visando

encontrar sistemas mais adequados que garantam maiores índices de cura e mais qualidade de vida aos pacientes. No entanto, as características específicas de cada célula

tornam cada tipo de tumor único, sendo impossível encontrar um tratamento que seja adequado para todas as neoplasias.³



Esquema 1. Representação do desenvolvimento do fármaco mecloretamina

O interesse por compostos de coordenação na quimioterapia do câncer começou no fim da década de 60, após ser descoberta a atividade antitumoral da *cis*-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina, **1**).⁴ Este fármaco representou a cura do câncer de testículos, e atualmente também é usado para combater vários outros tipos de tumores, em especial os sólidos, como de ovário, cabeça e pescoço, próstata e bexiga. Essa descoberta impulsionou as pesquisas

com complexos metálicos como possíveis agentes antitumorais, resultando na aprovação mundial de mais dois fármacos de platina(II), carboplatina (**2**) e oxaliplatina (**3**) (Figura 1).⁵ Apesar de representarem apenas 6% do total de medicamentos de comercialização mundial,⁶ os complexos de Pt(II) são utilizados em cerca de 50% dos tratamentos de câncer e movimentam mais de 1 bilhão de dólares anualmente.^{7,8}

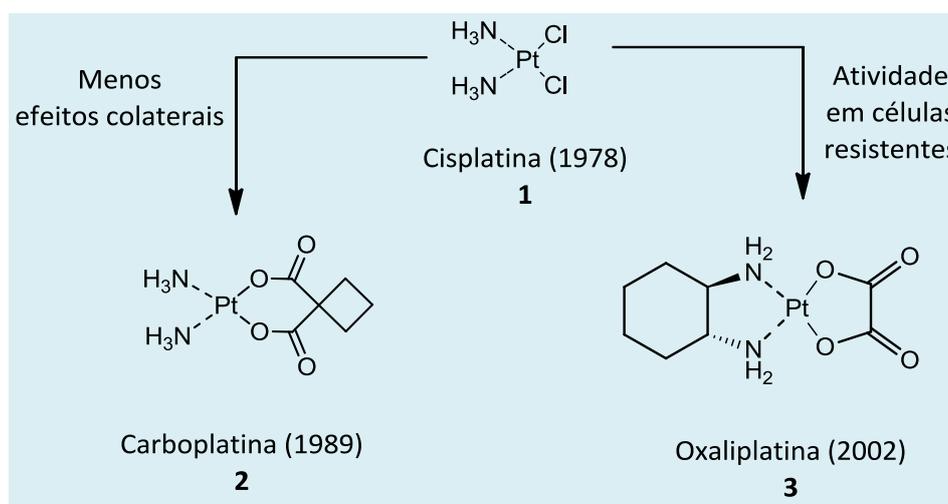


Figura 1. Complexos antitumorais aprovados para comercialização mundial

Apesar do sucesso, os metalofármacos de Pt(II) não estão livres dos inconvenientes apresentados por outros quimioterápicos, tais como resistência celular e uma série de efeitos colaterais, dentre eles nefrotoxicidade e neurotoxicidade, náuseas e vômitos.⁵ No entanto, os compostos de coordenação oferecem uma série de vantagens frente aos compostos orgânicos tradicionais. A multiplicidade de características inerentes aos centros metálicos, como seu estado de oxidação e número e geometrias de coordenação, e aos próprios ligantes, como a polaridade e a reatividade, permitem projetar e sintetizar uma variedade de compostos com variações da carga, da geometria e das propriedades cinéticas e termodinâmicas.^{9,10} Desse modo, é possível combinar as diferentes características no intuito de obter fármacos que sejam menos tóxicos e/ou possuam um espectro de atividade antitumoral mais amplo.

2. O DNA como alvo no tratamento de neoplasias

O DNA é o alvo farmacológico de vários fármacos usados atualmente em terapias medicinais ou em fase de investigação clínica avançada. A ideia de atingir o DNA para regular as funções celulares, a partir da modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação, é lógica e intuitivamente interessante. Os ácidos nucleicos são moléculas que estocam e transmitem a informação genética na célula, fornecendo instruções sobre quais proteínas e em que quantidade devem ser sintetizadas.¹¹ São polímeros lineares de

nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster. A cadeia de açúcar-fosfato aniônica é hidrofílica e permanece em contato com a solução aquosa do meio intracelular, enquanto as bases nitrogenadas, que são planares e mais hidrofóbicas, orientam-se para o interior. A orientação das ligações no DNA faz com que se formem duas cavidades (fendas), ditas maior e menor. A estrutura supramolecular da hélice dupla é mantida por várias forças não-covalentes, tais como, interações π - π entre os anéis aromáticos; ligações de hidrogênio entre as bases; atração eletrostática entre as cadeias açúcar-fosfato (negativas) e os cátions em solução.¹²

2.1. Tipos de interações entre complexos metálicos e o DNA

Apesar da vasta literatura sobre as interações entre complexos metálicos e o DNA, a natureza destas ligações, bem como suas geometrias, ainda é assunto em debate. O fato do centro metálico ser carregado positivamente faz com que os compostos de coordenação geralmente sejam capazes de ligar-se a biomoléculas negativamente carregadas, permitindo que proteínas e ácidos nucleicos sejam excelentes alvos para esses xenobióticos.¹³ A rica estrutura do DNA faz com que essa interação possa ocorrer de forma covalente, através da ligação direta do complexo ao DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato; ou de forma não-covalente através de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor do DNA, ou através da intercalação.^{14,15} A Figura 2 ilustra esquematicamente esses tipos de interação.

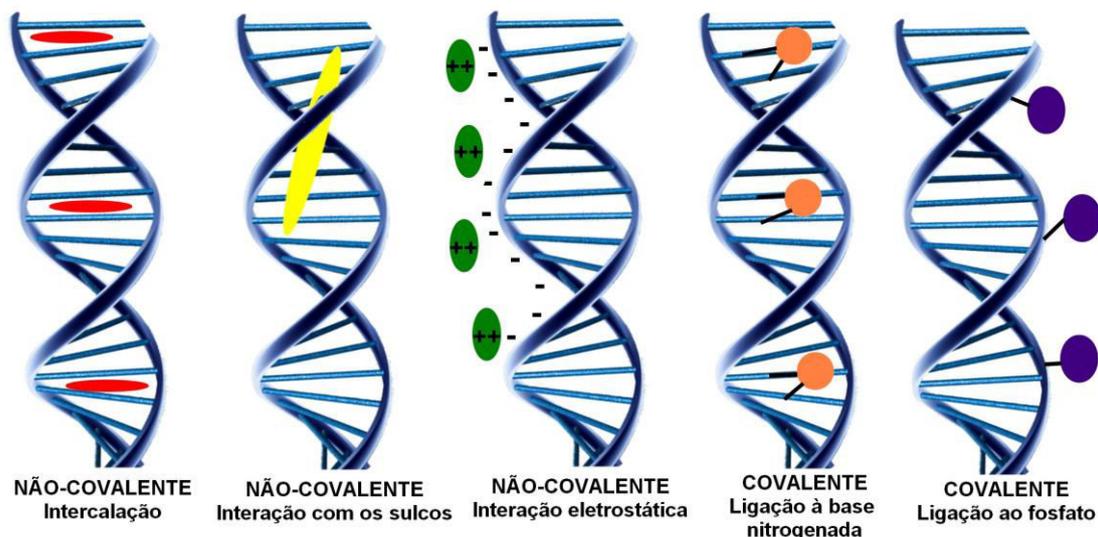


Figura 2. Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA

A formação das interações entre complexos metálicos e DNA é norteadas por vários princípios da Química Geral e da Química de Coordenação, como se segue:¹³

- os átomos de oxigênio e nitrogênio do DNA presentes nas bases nitrogenadas e/ou nos grupos fosfato são pontos ideais para a formação de ligações com o centro metálico;
- a coordenação é favorecida nos átomos com maior densidade eletrônica e menor impedimento estérico das bases nitrogenadas, como N7 de adenina e guanina e O2 da timina (Figura 3);
- complexos que contêm íons metálicos menores e pouco polarizáveis tendem a se ligar ao átomo de oxigênio, enquanto os que contêm íons metálicos maiores e muito polarizáveis se ligam preferencialmente ao nitrogênio, como

previsto pela teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson;¹⁶

- fatores como impedimento estérico e possibilidade de estabelecimento de ligação de hidrogênio entre o complexo e o DNA podem ser determinantes no tipo de interação observada;¹⁷
- a labilidade dos ligantes presentes no complexo afeta não somente sua capacidade de atingir o alvo farmacológico, como também a tendência na formação da ligação covalente com o DNA;¹⁸

as características estruturais e eletrônicas dos ligantes presentes no arcabouço molecular do complexo metálico (por exemplo, ligantes planares rígidos ricos em elétrons π favorecem a intercalação) são determinantes no tipo de interação observada.

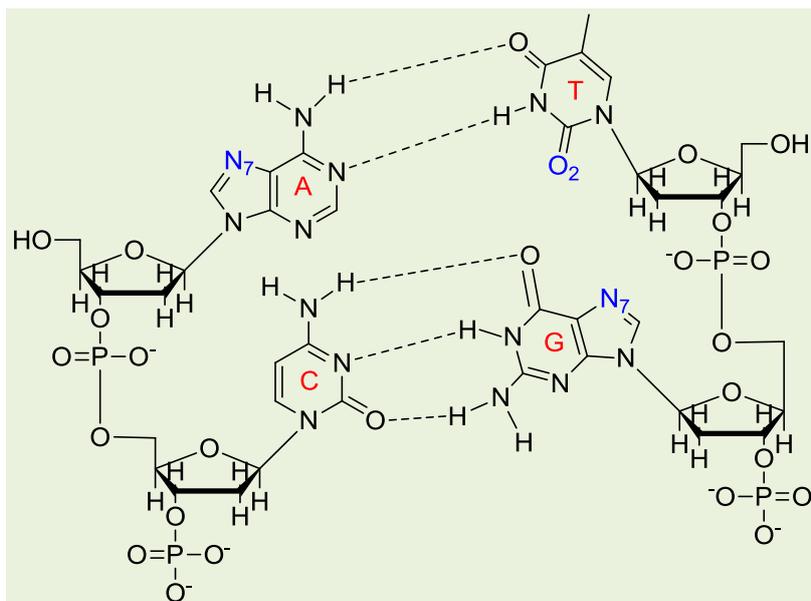


Figura 3. Estruturas das bases complementares na cadeia do DNA (A = adenina; T = timina; C = citosina; G = guanina). Os átomos indicados em azul são os mais disponíveis para coordenação ao centro metálico¹³

O mecanismo de ação da cisplatina (**1**) ilustra muitos desses tópicos. Ele consiste, inicialmente, em uma reação de hidrólise que ocorre com substituição dos ligantes abandonadores (cloro) por moléculas de água originando espécies com carga positiva. Pela teoria de Pearson, esses metabólitos têm grande afinidade por moléculas contendo nitrogênio e enxofre, podendo reagir especialmente com o DNA, RNA e proteínas. O principal tipo de interação com o DNA ocorre na posição N7 de adenina e guanina. A formação desses adutos com o DNA celular não apenas inibe a transcrição e replicação do DNA, como também induz a morte da célula.⁵ Já a carboplatina (**2**), apesar de apresentar mecanismo de ação semelhante, provoca menos efeitos colaterais nos pacientes, que pode ser explicado pela substituição dos cloretos por ligantes menos lábeis, como o carboxilato.

Os ligantes podem influenciar também a

seletividade das interações entre o complexo e o DNA, especialmente se forem volumosos ou capazes de estabelecer ligações de hidrogênio. Um exemplo deste efeito foi observado para complexos de Ru (II) contendo o ligante etilenodiamina.¹⁹ Ensaios realizados com nucleobases mostraram que a reatividade dos complexos foi maior quando foi possível o estabelecimento de ligações de hidrogênio, como na coordenação do N7 da guanina e do N3 da timina, e bem menor quando houve repulsão, como na coordenação do N3 da citosina e do N7 da adenina (Figura 4).

Em geral, a presença de ligantes planares com sistemas ricos em elétrons π permite a ocorrência de outro tipo de interação complexo-DNA, a intercalação. Este é um processo não-covalente, no qual uma molécula aromática se insere entre dois pares consecutivos de bases do DNA, que será discutido a seguir.

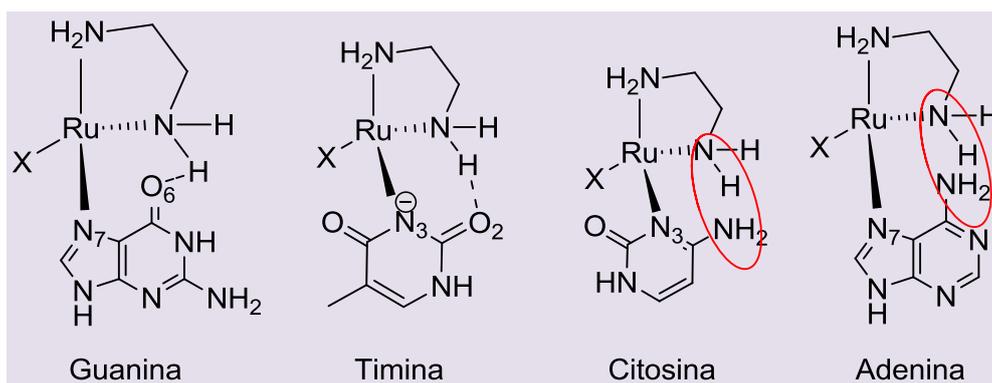


Figura 4. Efeitos da ligação de hidrogênio em sistemas complexo-nucleobase¹⁹

3. Metalintercaladores

3.1. Características da intercalação

Em termos específicos, a intercalação é a inserção de uma molécula aromática entre os pares de bases consecutivos do DNA²⁰ (Figura 5). As ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas e, principalmente, interações de empilhamento π entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas do agente intercalador contribuem para a estabilização do complexo intercalador-DNA. A inserção de um intercalador entre os pares de bases resulta em uma mudança substancial na estrutura do DNA, provocando alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice do DNA.²¹ Como resultado da intercalação, o esqueleto do DNA perde a estrutura helicoidal regular. Os ângulos de torção envolvendo os grupos açúcar-fosfato são alterados para acomodar o composto aromático, causando a separação dos pares de bases no sítio de intercalação a partir de um alongamento da dupla hélice (de 2,0 a 3,7 Å) e um decréscimo do diâmetro da hélice. O esqueleto do DNA não é flexível o suficiente para permitir que um intercalador seja inserido em cada espaçamento entre as bases. Uma vez preenchido um espaçamento, os adjacentes devem permanecer vazios, proporcionando um carregamento máximo de um intercalador a cada dois

espaçamentos. Este fenômeno, conhecido como o Princípio da Exclusão do Vizinho Adjacente, resulta em intervalos periódicos de 10,2 Å entre os intercaladores, correspondendo a 3 x 3,4 Å sítios de intercalação.²¹ Sugere-se que todas as modificações provocadas pelo agente intercalador na estrutura secundária do DNA previnem a replicação do DNA e, conseqüentemente, inibem o crescimento de cânceres ou causam a morte celular.²¹ O processo de intercalação foi também descrito como sendo uma etapa preliminar da mutagênese.²²

Outra estratégia interessante consiste na incorporação de um metal de transição na estrutura do intercalador, visto que é um modo atrativo de impor uma carga positiva à molécula. Com uma densidade elevada de carga negativa, o DNA atrai cátions e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas entre os átomos de oxigênio dos grupos fosfato do DNA e o intercalador podem contribuir significativamente para a formação e estabilização da supramolécula DNA-complexo metálico. Assim, os metalintercaladores são compostos de coordenação que possuem, no mínimo, um ligante intercalador.²⁴ Apesar de haver uma imensa variedade de ligantes com possibilidade de intercalação, em geral, todos eles possuem estruturas químicas baseadas em seis principais famílias de intercaladores: antracenos (4), acridinas (5), antraquinonas (6), fenantridinas (7), fenantrolinas (8) e elipticinas (9) (Figura 6).

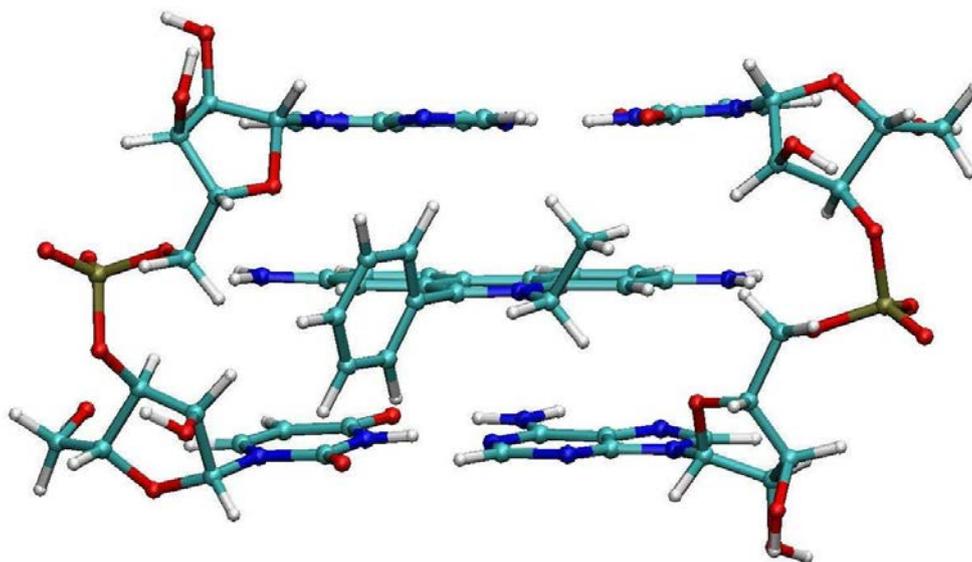


Figura 5. Intercalação do brometo de etídio entre as bases nitrogenadas do DNA²³

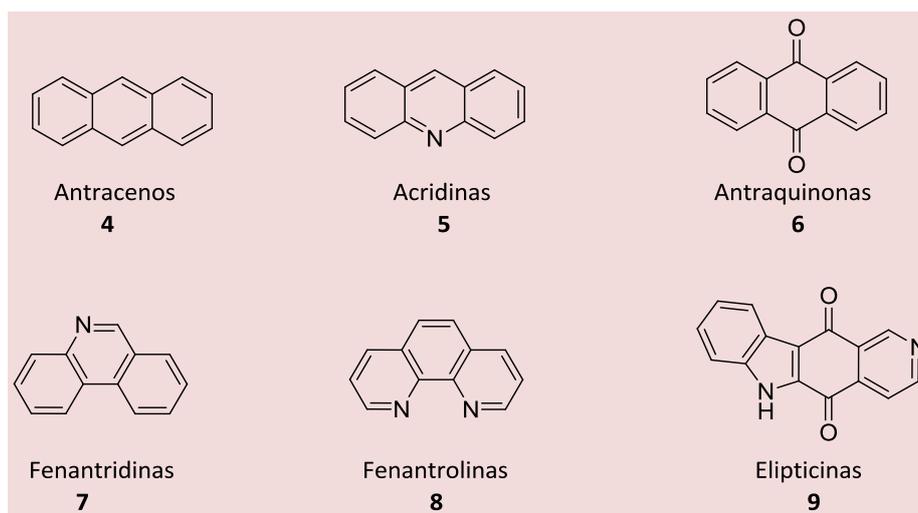


Figura 6. Estruturas dos ligantes intercaladores clássicos²¹

Além da presença do grupo intercalador, o planejamento de um metalintercalador envolve outras características, tais como, carga positiva não-localizada ao longo do sistema aromático; polarizabilidade elevada para a maximizar a interação π - π com os pares de bases do DNA e grupos polares para a formação de ligações de hidrogênio com as bases nitrogenadas (ex. grupos amino), auxiliando assim na estabilização da associação supramolecular complexo-DNA.^{21,24} A possibilidade de apresentar um mecanismo de ação diferente dos complexos

tradicionais (cisplatina e seus análogos), faz com que haja grande interesse nos metalintercaladores para o tratamento do câncer, visto que poderão ser uma opção em casos de resistência celular aos complexos tradicionais.

3.2. Breve histórico

O processo de intercalação foi evidenciado pela primeira vez em 1961 por

Lerman em estudos envolvendo a interação entre acridinas e DNA.²⁵ Atualmente, existem quatro intercaladores orgânicos aprovados pelo FDA para o tratamento de cânceres humanos: a daunorrubicina (**10**), a doxorubicina (**11**), a mitoxantrona (**12**) e a ansacrina (**13**) (Figura 7). A ação citotóxica

desses agentes é atribuída, pelo menos em parte, à sua capacidade de atuarem como venenos da enzima Topoisomerase II – ao se intercalarem ao DNA, eles estabilizam o complexo intermediário covalente da reação da Topo II, resultando na morte celular via apoptose.²⁶

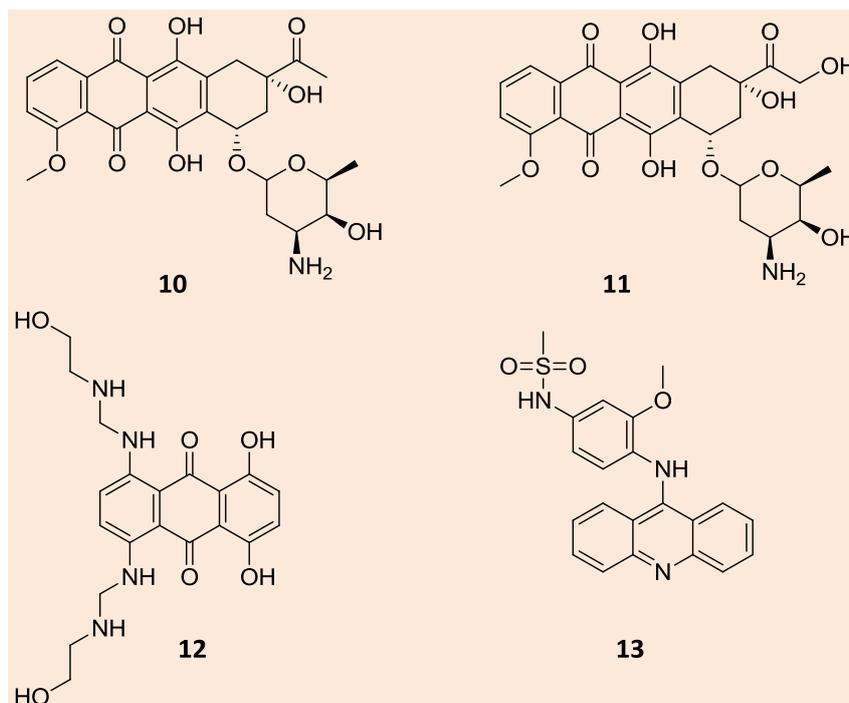


Figura 7. Intercaladores orgânicos comercializados para o tratamento do câncer²¹

A intercalação de complexos metálicos no DNA (Figura 8) foi inicialmente observada em 1950, quando Dwyer e colaboradores²⁷ estudavam a atividade biológica de complexos polipiridínicos de Ni(II) e Ru(II). Foi demonstrado que o composto **14** [Ru(phen)₃]²⁺ (phen = 1,10-fenantrolina) (Figura 8) apresentava intercalação no DNA. Vários outros complexos octaédricos, principalmente de Ru(II), foram investigados e revelaram a capacidade de se intercalarem ao DNA.^{21,24} A intercalação de complexos

quadrático planares foi primeiro demonstrada no composto **15** [Pt(terpy)(SCH₂CH₂OH)]⁺.²⁸ Posteriormente, foram avaliados os complexos **16** [Pt(phen)(en)]²⁺ e **17** [Pt(bpy)(en)]²⁺ (Figura 8), onde bpy = 2,2'-bipiridina, que também atuaram como intercaladores.²⁹ O composto **18** [Cu(bpy)₂]²⁺ (Figura 8), que é tetraédrico, não se intercala no DNA, indicando a influência da geometria do complexo na intercalação.³⁰

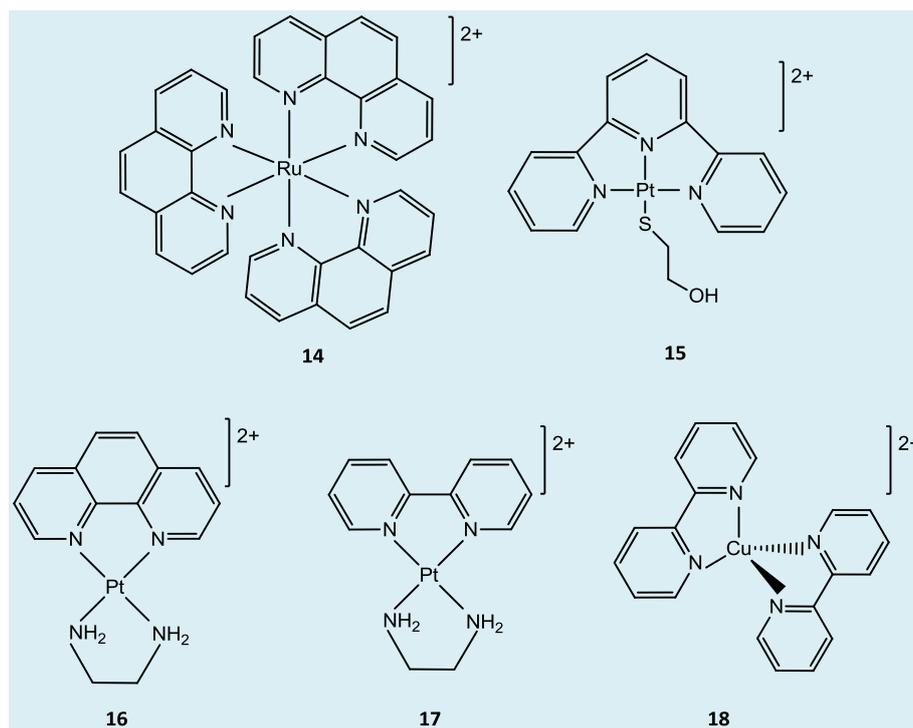


Figura 8. Exemplos de metalintercaladores octaédricos (**14**) e quadráticos planares (**15-17**) e de um não-intercalador tetraédrico (**18**)²⁷⁻³⁰

3.3. Bis-intercaladores

Nos últimos anos, muitos pesquisadores vêm adotando como estratégia a obtenção de bis-intercaladores, moléculas constituídas por dois conjuntos de anéis poliaromáticos unidos um ao outro por uma cadeia carbônica²¹ (Figura 9). Isto porque os bis-intercaladores podem apresentar uma citotoxicidade mais acentuada devido à sua capacidade de se ligar simultaneamente a um número maior de pares de bases e, também, de ter sua afinidade ao DNA aumentada. Além disso, podem exibir seletividade e especificidade maior pelo DNA em relação aos intercaladores mononucleares, permitindo o planejamento de fármacos específicos às células cancerosas. A afinidade elevada dos bis-intercaladores frente ao DNA pode ocasionar o aumento do número de adutos complexo-DNA e/ou tornar os adutos mais difíceis de serem reparados. Modificações conformacionais maiores/diferentes na estrutura do DNA, com comprometimento dos mecanismos de

reparo, também podem ser induzidas pela ação dos bis-intercaladores.

Lowe e colaboradores³¹ desenvolveram uma série de bis-intercaladores de platina(II), contendo terpiridinas substituídas como ligantes intercaladores, conectadas a uma variedade de cadeias rígidas de comprimento variável. O composto **19** (Figura 9) representa uma destas substâncias, o complexo $[\{Pt(terpy)\}_2-\mu-4,4'-vinilpiridina]^{4+}$. A citotoxicidade desta classe foi testada frente a um painel de seis linhagens de câncer de ovário: duas sensíveis à cisplatina (CH1 e A2780), três resistentes à cisplatina (SKOV-3, CH1cis e A2780cis) e uma resistente à doxorrubicina (CH1dox). Os bis-intercaladores mais carregados e portadores das cadeias mais curtas foram os mais citotóxicos. Todos os compostos testados apresentaram pouca ou nenhuma resistência cruzada frente às linhagens testadas. O bis-intercalador $[\{Pt(terpy)\}_2-\mu-4,4'-vinilpiridina]^{2+}$ **19** foi 13 vezes mais citotóxico que a cisplatina. Os bis-intercaladores descritos por Chan e colaboradores³² diferem

dos sintetizados por Lowe quanto ao uso de cadeias flexíveis de alcanos (composto **20**, Figura 9). Esses complexos apresentaram capacidade de intercalação frente ao DNA, com constantes de ligação da ordem de 10^6 a 10^7 mol/L⁻¹, consideravelmente maior que os valores encontrados para os intercaladores mononucleares (10^4 mol/L⁻¹), e mostraram

índices de citotoxicidade comparáveis ao da cisplatina frente a cinco linhagens de tumor humano. Diferentemente dos bis-intercaladores descritos por Lowe e colaboradores, os complexos sintetizados por Chan e colaboradores, portadores das cadeias mais longas, demonstraram ser os mais citotóxicos.

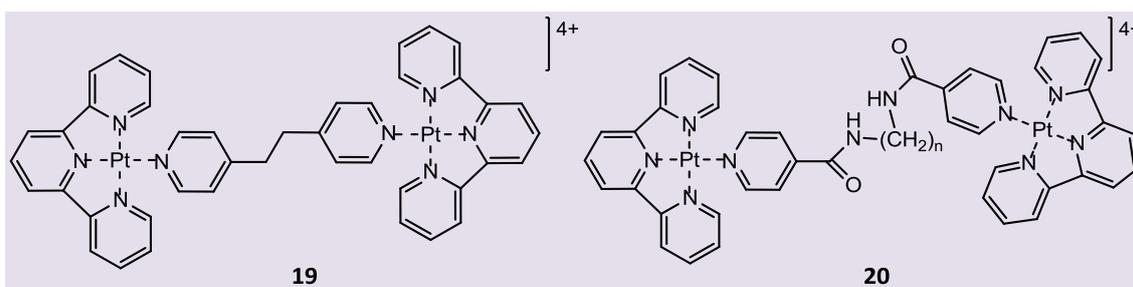


Figura 9. Estrutura química de alguns tipos bis-intercaladores de platina(II) portadores de cadeias carbônicas rígidas (**19**) ou flexíveis (**20**)^{31,32}

3.4. Intercaladores sinérgicos

Nos últimos 20 anos, vários autores examinaram o sinergismo na combinação de diferentes grupos funcionais em um mesmo composto. Em geral, o intercalador deve ser conectado a moléculas capazes de provocarem outros tipos de danos ao DNA, como por exemplo, os agentes alquilantes. Os agentes intercaladores sinérgicos têm sido desenvolvidos na tentativa de aumentar a afinidade de ligação frente ao DNA, auxiliar no transporte do fármaco e/ou alterar a seletividade de seus adutos no DNA.²¹ Um exemplo bastante ilustrativo da ação de um

metalointercalador sinérgico é descrito por Bowler e Lippard,³³ no qual o arcabouço do dicloro(etilenodiamina)platina(II) foi ligado à molécula de laranja de acridina (**21**), (Figura 10) através de uma cadeia com um número variável de átomos de carbono. Os dados de modelagem molecular e os experimentos de interação complexo-DNA mostraram que a intercalação do laranja de acridina e a ligação de coordenação da platina(II) ao DNA ocorrem simultaneamente, com uma separação que varia de um a três pares de base. Essa interação cooperativa tem um efeito muito pronunciado na conformação do DNA, conduzindo a um desenrolamento significativo da hélice.

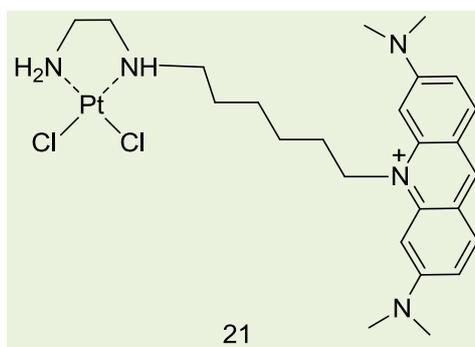


Figura 10. Estrutura química de um intercalador sinérgico de platina(II)³³

4. Técnicas utilizadas no estudo da interação complexo-DNA

Várias técnicas vêm sendo empregadas no estudo das interações covalentes e não-covalentes complexo-DNA. A seguir, estão listadas as mais recorrentes.

4.1. Reação com a guanosina

Os ensaios envolvendo as reações dos complexos com nucleófilos de importância biológica podem fornecer indicativos do

mecanismo de ação destes compostos no organismo.³⁴ Uma das avaliações mais simples é feita com constituintes do DNA, tais como, o nucleosídeo guanosina o e nucleotídeo 5'-GMP (guanosina 5'-monofosfato), ambos contendo a base nitrogenada guanina (Figura 11). Este ensaio permite evidenciar se, assim como a cisplatina, o complexo pode interagir covalentemente com o DNA ligando-se à base guanina. De maneira geral, essa interação é verificada em complexos que contêm bons ligantes abandonadores em sua estrutura.

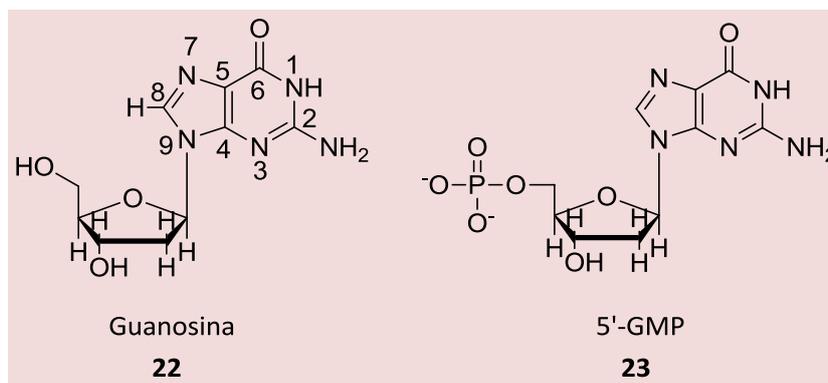


Figura 11. Estruturas do nucleosídeo guanosina e do nucleotídeo 5'-GMP

A maneira como ocorre a coordenação depende do pH da solução e da presença de outros nucleófilos. No entanto, os modos de coordenação mais comuns são: monocoordenação através dos nitrogênios N1, N3 ou N7; quelatação, envolvendo N7 e O6; ligação de compostos polinucleares a N1 e N7; ligação através do grupamento fosfato.^{35,36} A utilização destes modelos é relativamente simples, e a formação do produto da interação complexo-DNA pode ser evidenciada por espectroscopia de RMN de ^1H e espectrometria de massas.³⁷ No caso de complexos que se ligam ao DNA de maneira similar à cisplatina, através do N7, a principal modificação no espectro de RMN de ^1H é aquela que corresponde ao H8. Este sinal aparece em cerca de 7,9 ppm no espectro da

guanosina livre, sendo deslocado cerca de 0,5 ppm para campo baixo, em função da desproteção causada pela formação da ligação metal-N7.³⁸

4.2. Ensaio de mudança da mobilidade eletroforética do DNA (EMSA)

Consiste num método eficiente para estudar a capacidade dos complexos de interagir com o DNA. O experimento é baseado na diferença de mobilidade eletroforética de moléculas de DNA, de acordo com o seu tamanho ou a sua forma. O DNA plasmideal é uma molécula circular, covalentemente fechada (forma

superenrolada – *supercoiled* – SC) (Figura 12). Dependendo das condições, ela pode se converter à forma circular relaxada (*open circular* – OC). A forma circular superenrolada (SC) do DNA é a mais compacta e, portanto, passa com mais facilidade entre as cavidades

do gel, possuindo maior velocidade de migração. Por outro lado, a forma circular relaxada (OC) se parece com um anel, sendo mais volumosa do que a forma SC, o que reduz a mobilidade da molécula.¹²

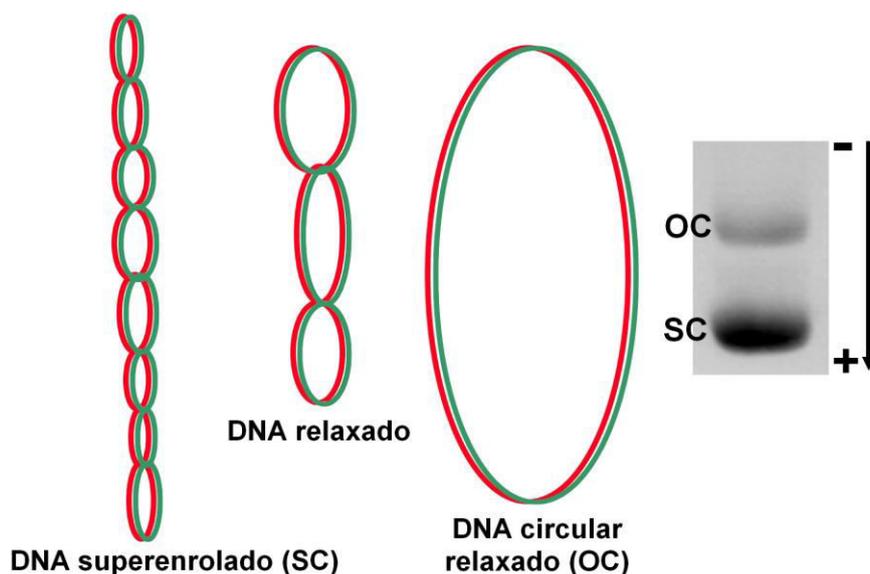


Figura 12. Representação esquemática das formas do DNA plasmideal observadas por eletroforese em gel de agarose

O experimento é iniciado através da incubação do DNA plasmideal em diferentes concentrações do complexo, sendo então, submetido à eletroforese. A consequência da interação do complexo com DNA é a relaxação de sua forma superenrolada, o que se reflete em sua velocidade de migração. A leitura é feita sob luz UV, após coloração com brometo de etídio, que exibe forte fluorescência quando se intercala no DNA.³⁹

Um outro dado importante é o ângulo do desenrolamento (φ) induzido por um composto no DNA, que fornece informações valiosas a respeito do tipo de interação entre eles. Através dele é possível evidenciar se a interação complexo-DNA se dá através de ligação covalente, intercalação ou uma combinação de ambas as formas. Ele pode ser calculado a partir da equação 1:

$$\varphi = 18 \sigma / r_b(c) \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

σ é a densidade super-helicoidal, que é função da força iônica e da temperatura do experimento;

$r_b(c)$ é a razão composto-nucleotídeo na qual ocorre a comigração das formas superenrolada e totalmente relaxada do DNA.

Os ângulos de desenrolamento encontrados para cisplatina e brometo de etídio são, 13° e 26°, respectivamente. Assim, valores de φ menores que 13° indicam a ocorrência de adutos monofuncionais; entre 13-26° φ aumenta na ordem adutos bifuncionais < aduto monofuncional e intercalação < aduto bifuncional e intercalação < intercalação.

4.3. Viscosidade

Os experimentos de viscosidade são uma técnica de baixo custo que permite distinguir três dos principais modos de interação frente ao DNA.²¹ Isto porque a intercalação de uma molécula no DNA resulta no alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice, aumentando a viscosidade da solução. Para os compostos que formam ligações covalentes coordenadas frente ao DNA, como a cisplatina, observa-se um decréscimo na viscosidade da solução de DNA, pois distorcem a dupla hélice e reduz-se o comprimento de ponta-a-ponta da molécula do DNA. Os compostos que atuam nos sulcos do DNA não modificam o comprimento da molécula, logo a viscosidade da solução não sofre alteração significativa.

4.4. Titulação espectrofotométrica para determinação de K_b

A espectroscopia eletrônica de absorção é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo da ligação entre o DNA e os complexos metálicos. O espectro de absorção na região do UV-Vis do DNA apresenta uma banda intensa em 260 nm, originária dos grupos cromofóricos presentes nas bases nitrogenadas. Tanto a banda do DNA, quanto as bandas do complexo sofrem mudanças quando há algum tipo de interação entre eles e, portanto, ambas podem ser monitoradas nesse tipo de estudo.⁴⁰

Quando ocorre a interação de um complexo ao DNA por intercalação, o orbital π^* do ligante intercalador pode interagir com o orbital π dos pares de base do DNA e, assim, diminuir a energia da transição $\pi-\pi^*$, resultando em batocromismo. Em contrapartida, o orbital π está parcialmente preenchido com elétrons, diminuindo a probabilidade das transições e, conseqüentemente, resultando em hipocromismo.⁴¹ Desse modo, a combinação de batocromismo e hipocromismo é

característica de intercalação, enquanto o hipercromismo é associado a outros tipos de interação, como por atração eletrostática ou por ligação covalente.⁴⁰

A intensidade da interação entre um complexo e o DNA pode ser conhecida através do cálculo da constante intrínseca de ligação (K_b) de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand⁴² (2):

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K_b (\epsilon_B - \epsilon_F)$$

Eq. 2

onde:

$[\text{DNA}]$ é a concentração adicionada de DNA; $\epsilon_A = A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$, ϵ_F é o coeficiente de absorvidade molar do complexo livre e ϵ_B é o coeficiente de absorvidade molar do complexo ligado ao DNA. Assim, a constante K_b é a razão entre os coeficientes angular e linear de um gráfico $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$.

Esta equação vem sendo aplicada com sucesso na obtenção de K_b para diversos sistemas do tipo complexo-DNA.

4.5. Desnaturação térmica do DNA

A desnaturação do DNA ocorre quando as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas complementares são rompidas e as fitas se separam, formando duas fitas simples. Esse processo pode ocorrer, por exemplo, por uma mudança brusca no pH ou pelo aumento da temperatura.²¹ A temperatura de desnaturação (T_m) é definida como a temperatura na qual metade das cadeias de DNA está na forma de dupla fita e a outra metade como fita simples (Figura 13). Ela pode ser determinada por espectroscopia eletrônica na região do UV, monitorando-se a variação na absorção a 260 nm com o aumento da temperatura. Isto porque as ligações de hidrogênio limitam a ressonância dos anéis aromáticos das bases nitrogenadas

e, conseqüentemente, a absorvância da soluçãõ. Quando ocorre desnaturaçãõ, vê-se um efeito hipercrômico de cerca de 40% em

funçãõ da ruptura das ligações de hidrogênio.⁴⁰

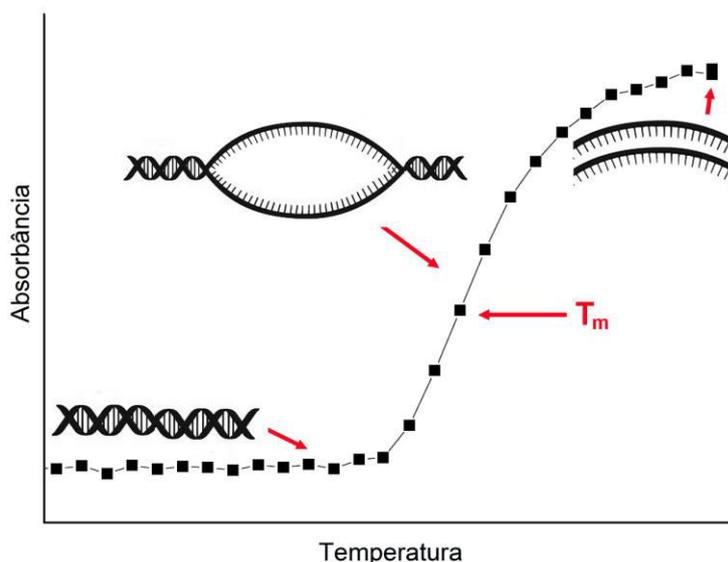


Figura 13. Exemplo de uma curva de desnaturaçãõ térmica do DNA

A interaçãõ de moléculas com o DNA pode afetar sua temperatura de desnaturaçãõ, em funçãõ de maior estabilizaçãõ/desestabilizaçãõ da dupla hélice. Assim, esse experimento permite diferenciar compostos que interagem com o DNA através de intercalaçãõ ou ligaçãõ externa. A intercalaçãõ provoca um aumento significativo em T_m , enquanto outros tipos de interaçãõ causam apenas pequenas variações.⁴³

4.6. Espectroscopia de fluorescência

O experimento de competiçãõ com o intercalador clássico brometo de etídio (BET) vem sendo amplamente utilizado para fornecer informações a respeito do modo de interaçãõ de um determinado composto com o DNA. A fluorescência do BET aumenta cerca de 30 vezes na presença de DNA, como conseqüência da forte intercalaçãõ que ocorre.⁴⁴ A presença de outro composto intercalador reduz a fluorescência emitida pelo sistema BET-DNA, em funçãõ da

competiçãõ pelos sítios do biopolímero.⁴⁰ Desse modo, a fluorescência do BET-DNA é medida na ausênça e na presença do complexo estudado.

A supressãõ da fluorescência em um determinado sistema pode se dar por um processo dinâmico ou estático. A supressãõ dinâmica é um processo colisional, e isso requer o contato entre as espécies envolvidas. Em conseqüência, ela é proporcional à concentraçãõ do agente supressor e da sua capacidade de difusãõ no meio. O processo estático é resultado da formaçãõ de um complexo não-fluorescente entre o fluoróforo e o supressor e, portanto, o grau de supressãõ está relacionado à extensãõ da formaçãõ deste complexo.⁴⁵ A análise quantitativa da supressãõ é feita utilizando-se a equaçãõ de Stern-Volmer:

$$I_0/I = 1 + K_{sv}r$$

onde:

I_0 e I representam a intensidade da fluorescência na ausênça e na presença do

complexo, respectivamente;

r é a razão entre as concentrações de complexo e DNA ($[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$);

K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, cujo valor é dado pelo coeficiente angular da reta de um gráfico de I_0/I em função de r .

Pequenos desvios da linearidade devem estar associados à ocorrência de ambos os mecanismos de supressão. Sugere-se que no caso de metalintercaladores primeiramente ocorra, prioritariamente, o mecanismo estático, pela intercalação do complexo ao DNA, e posteriormente, com o aumento na concentração do complexo, uma maior contribuição do mecanismo dinâmico.

5. Considerações Finais

O design de novos fármacos é uma tarefa complexa que vai além de melhorar a sua especificidade da droga frente ao seu alvo biológico. Sabendo-se que, em muitos casos, apenas uma fração diminuta do xenobiótico atinge o alvo farmacológico, novas estratégias devem ser desenvolvidas para aumentar a sua acumulação nas proximidades do DNA celular. Essas estratégias deveriam ser capazes de prolongar o tempo de circulação, aumentar o acúmulo específico no tecido, intensificar a eficácia da absorção celular e nuclear e elevar a especificidade e afinidade frente ao DNA. A complexidade do sistema biológico torna muito difícil incorporar simultaneamente todos esses fatores em um único algoritmo para o design de fármacos. Particularmente, a estratégia direcionada na especificidade é bastante viável, uma vez que a estrutura do DNA é bem conhecida. Uma das possibilidades é a utilização de metalintercaladores, compostos que aliam as vantagens oferecidas por complexos metálicos à capacidade de intercalação no DNA exibida por uma série de ligantes orgânicos. Muitos desses compostos vêm sendo investigados, apresentando resultados promissores.

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para investigar os efeitos de uma interação específica de um determinado agente na estrutura do DNA. Uma das técnicas envolve o uso de moléculas pequenas, capazes de reconhecer superfícies que são únicas desse ácido nucleico, e de ligar a regiões específicas do DNA. A base molecular para o planejamento de fármacos capazes de se ligar ao DNA de modo específico surge da habilidade de identificar os elementos estruturais que são responsáveis pela especificidade da ligação e pela estabilização do complexo fármaco-DNA. Uma vez reconhecidos esses parâmetros, novos análogos com elevada seletividade e afinidade poderão ser sintetizados e testados.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP (processos 2012/15486-3 e 2014/11340-0) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

¹ a) Chabner, B. A.; Roberts, T. G. Jr. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 65; [CrossRef] [PubMed] b) Sítio da Química Nova Interativa. Disponível em: <http://qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=bgnymxUjoxaDmfHDxSyHlmuaslfx1jBqQzB6VqscWAe4Ulo9chXhN4RF5TW5GkeOMZd_Szjk0TXINpro5zXA-w>. Acesso em: 3 dezembro 2014.

² a) DeVita, V. T. Jr.; Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research* **2008**, *68*, 8643; [CrossRef] [PubMed] b) Wilcox, W. S.; Schabel, F. M.; Skipper, H. E. Experimental evaluation of potential anticancer agents XV. On the relative rates of growth and host kill of "single" leukemia cells that survive in vivo

- cytoxin therapy. *Cancer Research* **1966**, *26*, 1009. [PubMed]
- ³ Florea, A-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* **2011**, *3*, 1351. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Rosemberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **1969**, *222*, 385. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* **2007**, *7*, 573. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Bravo-Gómez, M. E.; Ruiz-Azuara, L. *New approaches in the treatment of cancer*; Vazquez, C. M. et al., eds.; Nova Science Publishers: New York, 2010, cap. 2.
- ⁷ Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Transactions* **2008**, *2*, 183. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Sanchez-Cano, C.; Hannon, M. J. Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. *Dalton Transactions* **2009**, *48*, 10702. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design* **2010**, *16*, 1813. [CrossRef]
- ^{10 10} Ronconi, L.; Sadler, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews* **2007**, *251*, 1633. [CrossRef]
- ¹¹ Hannon, M. J. Supramolecular DNA recognition. *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 280. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Calladine, C. R.; Drew, H.; Luisi, B.; Travers, A.; *Understanding DNA: the molecule and how it works*, 3a ed, Elsevier: Amsterdam, 2004.
- ¹³ Turel, I.; Kljun J. Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 2661. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Keene, F. R.; Smith, J. A.; Collins, J. G. Metal complexes as structure selective binding agents for nucleic acids. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 2021. [CrossRef]
- ¹⁵ Boer, D. R.; Canals, A.; Coll, M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. *Dalton Transactions* **2009**, *3*, 399. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: fundamental principles. *Journal of Chemical Education* **1968**, *45*, 581. [CrossRef]
- ¹⁷ Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **2009**, *91*, 1198. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Fontes, A. P. S.; Almeida S. G. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova* **1997**, *20*, 398. [CrossRef]
- ¹⁹ Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 173. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Strekowski, L.; Wilson, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutation Research* **2007**, *623*, 3. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Wheate, N. J.; Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Kemp, S.; Aldrich-Wright, J. R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2007**, *7*, 627. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Waring, M. J. DNA modification and cancer. *Annual Review of Biochemistry* **1981**, *50*, 159. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Sítio da Wikipedia. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_intercalation2.jpg>. Acesso em: 18 setembro 2014.
- ²⁴ Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chemical Communications* **2007**, *44*, 4565. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3*, 18. [CrossRef]

- ²⁶ Hande, K. R. Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics* **2008**, *3*, 13. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Dwyer, F. P.; Gyarfás, E. C.; Rogers, W. P.; Koch, J. H. Biological activity of complex ions. *Nature* **1952**, *170*, 190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Bond, P. J.; Langridge, R.; Jennette, K. W.; Lippard, S. J. X-ray fiber diffraction evidence for neighbor exclusion a binding of a platinum metallointercalation reagent to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1975**, *72*, 4825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Howe-Grant, M.; Lippard, S. J. Binding of platinum(II) intercalation reagents to deoxyribonucleic acid. Dependence on base-pair composition, nature of the intercalator, and ionic strength. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Norden, B. Structure of DNA metal complexes in solution studied by linear and circular dichroism. [Pt(II)(ethylenediamine)(2,2'-dipyridine)]²⁺ binds strongly to DNA by intercalation. [Cu(II)(2,2'-dipyridine)₂]²⁺ is not intercalated. *Inorganica Chimica Acta* **1978**, *31*, 83. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Lowe, G.; Droz, A. S.; Vilaivan, T.; Waever, G. W.; Park, J. J.; Pratt, J. M.; Tweedale, L.; Kelland, L. R. Cytotoxicity of 2,2':6',2''-terpyridineplatinum(II) complexes against human ovarian carcinoma. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 3167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Chan, H. L.; Ma, D. L.; Yang, M.; Che, C. M. Bis-intercalative dinuclear platinum(II) 6-phenyl-2,2'-bipyridine complexes exhibit enhanced DNA affinity but similar cytotoxicity compared to the mononuclear unit. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2003**, *8*, 761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Bowler, B. E.; Lippard, S. J. Modulation of platinum antitumor drug binding to DNA by linked and free intercalators. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Summa, N.; Schiessl, W.; Puchta, R.; Hommes, N. E.; Eldik, R. Thermodynamic and kinetic studies on reactions of Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles. *Inorganic Chemistry* **2006**, *45*, 2948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Wirth, W.; Blotevogel-Baltronat, J.; Kleinkes, U.; Sheldrick, W. S. Interaction of (amine)M(II) complexes (amine=/dien, en; M=/Pd, Pt) with purine nucleoside 2', 3'- and 5'-monophosphates:/the role of the phosphate site for specific metal fragment-nucleotide recognition by macrochelation. *Inorganica Chimica Acta* **2002**, *339*, 14. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Zhu, S.; Matilla, A.; Tercero, J. M.; Vijayaragavan, V.; Walmsley, J. A. Binding of palladium(II) complexes to guanine, guanosine or guanosine 5'-monophosphate in aqueous solution: potentiometric and NMR studies. *Inorganica Chimica Acta* **2004**, *357*, 411. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Chevry, A.; Teyssot, M.-L.; Maisonia, A.; Lemoine, P.; Viossat, B.; Traïkia, M.; Aitken, D. J.; Alves, G.; Morel, L.; Nauton, L.; Gautier, A. Click chelators – the behavior of platinum and palladium complexes in the presence of guanosine and DNA. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2010**, *2010*, 3513. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Gautier, A.; Morel, L.; Quilles, M. B.; Carlos, I.Z.; Treu-Filho, O.; Frem, R. C. G.; Mauro, A. E.; Netto, A. V. G. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction of Pd(II) complexes bearing N'-methyl-3,5-dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole. *Polyhedron* **2013**, *65*, 214. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Keck, M. V.; Lippard, S. J. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3386. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2013**, *124*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Gao, E.; Zhu, M.; Liu, L.; Huang Y.; Wang, L.; Shi, C.; Zhang, W.; Sun, Y. Impact of the carbon chain length of novel palladium(II) complexes on interaction with DNA and cytotoxic activity. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 3261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁴² Mudasir; Yoshioka, N.; Inoue, H. DNA binding of iron(II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999**, *77*, 239. [[CrossRef](#)]

⁴³ Grueso, E.; López-Pérez, G.; Castellano, M.; Prado-Gotor, R. Thermodynamic and structural study of phenanthroline derivative ruthenium complex/DNA interactions: probing partial intercalation and binding

properties. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *106*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁴⁴ Olmsted, J. III; Kearns, D. R. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry* **1977**, *16*, 3647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁴⁵ Lakowicz, J. R.; Weber, G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]